FRANCISCO MARCOS ALENCAR DA SILVA

**Análise molecular dos genes CAPN3 e FKRP em pacientes com
distrofia muscular tipo cinturas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Neurologia
Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

São Paulo

2016

FRANCISCO MARCOS ALENCAR DA SILVA

**Análise molecular dos genes *CAPN3* e *FKRP* em pacientes com
distrofia muscular tipo cinturas**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Versão corrigida contendo as
alterações solicitadas pela comissão
julgadora em 12 de setembro de 2016.
A versão original encontra-se em
acervo na Biblioteca da FMUSP e na
Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD), de
acordo com a resolução CoPGr 6018,
de 13 de outubro de 2011.

Programa de Neurologia
Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Francisco Marcos Alencar da

Análise molecular dos genes CAPN3 e FKRP em pacientes com distrofia muscular do tipo cinturas / Francisco Marcos Alencar da Silva. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Neurologia.

Orientador: Edmar Zanoteli.

Descritores: 1.Distrofia muscular do cingulo dos membros 2.Distrofias musculares/diagnóstico 3.Distrofia muscular do cingulo dos membros/genética 4.Distrofia muscular do cingulo dos membros/patologia 5.Calpaína 6.*Western blotting*

USP/FM/DBD-219/16

DEDICATÓRIA

Para meu pai, Raimundo Mota da Silva, que sempre sonhou em ver os filhos formados.

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha mãe, meu irmão, minhas irmãs, meus sobrinhos e em especial ao meu pai que não se encontra mais presente fisicamente, mas sei que está sempre me acompanhando em espírito.

À Dante Souza e Souza, por ser meu porto seguro em todas as situações.

Ao Prof. Dr. Edmar Zanoteli pela orientação e pela oportunidade oferecida e ao Prof. Dr. Gerson Chadi por todo o apoio durante a realização da pesquisa;

Aos companheiros de laboratório: Alan Fappi, Juliana Neves, Vanessa Rizzato, Rubens Larina e Dra. Jéssica Maximino pelo apoio na realização dos experimentos e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do LIM45, em especial Sarah, Iolanda, Florence Gilmar e Cecília Ikegami.

Ao médico Eduardo Estephan pelo enorme auxílio na coleta dos dados clínicos dos pacientes e à Eliene Dutra pelo auxílio prestado na coleta dos dados histológicos.

À Elisângela Quedas e Lucas Santana do LIM-25, que sempre se disponibilizaram para a entrega os resultados do sequenciamento dentro dos prazos previstos.

À Ma. Thaís Virgínia por ter me indicado ao Prof. Dr. Edmar, para estágio no laboratório.

Aos queridos amigos da minha cidade natal (Imperatriz/MA) em especial João Paulo, Jeferson, Janaína e Fernanda.

Aos amigos desde a época da graduação, Ananda Martins e Anderson Moraes. Obrigado por tudo mesmo, vocês são os melhores amigos que alguém poderia ter.

Aos amigos que conheci em São Paulo e que se tornaram fundamentais em minha vida, em especial Thaysa Freitas e Thaís Estrela.

RESUMO

Silva FMA. *Análise molecular dos genes CAPN3 e FKRP em pacientes com distrofia muscular do tipo cinturas* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: As distrofias musculares de cinturas (*limb-girdle muscular dystrophies* - LGMD) são causadas por mutações em uma grande variedade de genes que codificam proteínas musculares, podendo ser herdadas de forma autossômica dominante ou recessiva. O diagnóstico é feito tanto através de exame de biópsia muscular que mostra um padrão histológico distrófico ao lado de deficiência específica de proteínas musculares quanto por estudo genético. Em alguns subtipos de LGMD não é possível fazer o diagnóstico específico pela biópsia muscular, tais como na deficiência da calpaína-3 (CAPN3) e da proteína relacionada a fukutina (FKRP). Nestes casos, portanto, o exame molecular é de grande valor para a confirmação do diagnóstico. **Objetivos:** Analisar os genes *CAPN3* e *FKRP* em pacientes com diagnóstico histológico de LGMD e verificar a expressão proteica da CAPN3 nesses pacientes, correlacionando com as mutações identificadas e com o quadro clínico e histológico dos mesmos. **Resultados:** Fizeram parte deste estudo 36 pacientes com LGMD provenientes do ambulatório de miopatias do HC-FMUSP em que a biópsia muscular não identificou deficiência de distrofina, disferlina, caveolina-3 e sarcoglicanas. Destes, nove (25%) foram diagnosticados com LGMD2A, seis (17%) com LGMD2I e em 21 (58%) não foi possível identificar o subtipo específico. Foram encontradas mutações patogênicas no gene *CAPN3* em oito pacientes, sendo em homozigose em dois casos, heterozigose composta em cinco casos e em heterozigose em um caso. Em um caso o diagnóstico de LGMD2A foi realizado baseado apenas na análise da expressão da proteína CAPN3 no tecido muscular. Em seis pacientes foram identificadas mutações patogênicas no *FKRP*, sendo em homozigose em cinco casos e em heterozigose em um caso. A maioria dos pacientes com LGMD2I (cinco casos) apresentava a mutação c.826C>A. Foi observada ausência total ou parcial da expressão da CAPN3 em

pacientes com LGMD2A. Conclusões: O presente estudo mostrou que mutações nos genes *CAPN3* e *FKRP* são frequentes em pacientes com diagnóstico clínico e histológico de LGMD. A análise da expressão da CAPN3 se mostrou como uma importante ferramenta no diagnóstico da LGMD2A.

Descritores: 1.Distrofia muscular de cinturas; 2.Distrofias musculares/diagnóstico; 3.Distrofia muscular de cinturas/genética; 4.Distrofia muscular de cinturas/patologia; 5.Calpaína; 6.*Western blotting*.

ABSTRACT

Silva FMA. *Molecular analysis of the CAPN3 and FKRP genes in patients with limb-girdle muscular dystrophy* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Introduction: The Limb-Girdle Muscular Dystrophies (LGMD) are caused by mutations on a wide variety of genes that encode muscular proteins which can be inherited in dominant or recessive autosomal forms. The diagnosis is made either by genetic study or by muscle biopsy which shows a dystrophic histologic pattern with specific deficiency of muscular proteins. On some LGMD subtypes such as calpain-3 (CAPN3) and fukutin related protein (FKRP) deficiencies it is not possible to make a specific diagnosis by muscle biopsy. In these cases, the molecular exam is of great value to confirm the diagnosis. **Objectives:** Analyze the *CAPN3* and *FKRP* genes in patients with histological diagnoses of LGMD, and verify the protein expression of CAPN3 on these patients correlating it with the identified mutations and their clinical and histological pattern. **Results:** Thirty-six patients with LGMD, where the muscular biopsy did not identify deficiency of dystrophin, dysferlin, caveolin-3 and sarcoglycans, from the Muscle Ambulatory of HC-FMUSP took part in this study. Of these, nine (25%) were diagnosed with LGMD2A, six (17%) with LGMD2I, and on 21 of them (58%), it was not possible to identify the specific subtype. Pathogenic mutations on *CAPN3* were found in eight patients, being homozygous in two cases, compound heterozygous in five cases and heterozygous in one case. The diagnosis of LGMD2A in one patient was done based exclusively by CAPN3 protein analysis on the muscle tissue. Pathogenic mutations on *FKRP* were found in six patients, being homozygous in five cases and heterozygous in one case. Most of the patients with LGMD2I (five cases) presented the mutation c.826C>A. It was observed total or partial absence of the CAPN3 expression in patients with LGMD2A. **Conclusions:** The study showed that mutations on *CAPN3* and *FKRP* are frequent in patients with clinical and histological diagnosis of LGMD. The CAPN3 expression analysis proved as an important tool in the LGMD2A diagnosis.

Descriptors: 1.Muscular dystrophies, limb-girdle; 2.Muscular dystrophies/diagnosis; 3.Muscular dystrophies, limb-girdle/genetics; 4.Muscular dystrophies, limb-girdle/pathology; 5.Calpain; 6.*Blotting, western*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Proporção entre os diferentes subtipos de LGMD em um grupo de 89 pacientes	23
Figura 2 – Frequência de pacientes com deficiência primária nas proteínas disferlina e sarcoglicanas e com diagnóstico de calpainopatia e de FKRP em um grupo de 69 casos de LGMD.....	24
Figura 3 – Frequência de pacientes com LGMD2A e LGMD2I em um grupo de 36 casos de LGMD sem diagnóstico definido	24
Figura 4 – Alterações histológicas na biopsia muscular de pacientes com LGMD2A.....	28
Figura 5 – Marcação da proteína disferlina em um paciente com LGMD2A	29
Figura 6 – Frequência das 21 variantes encontradas no gene <i>CAPN3</i> em 36 pacientes com LGMD	31
Figura 7 – Distribuição das mutações identificadas no estudo ao longo do gene <i>CAPN3</i>	33
Figura 8 – Alterações histológicas em pacientes com LGMD2I.	37
Figura 9 – Alterações histológicas em pacientes com LGMD sem subtipo identificado	41
Figura 10 – WB das proteínas CAPN3 e disferlina em 14 pacientes com LGMD	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distrofias musculares de cinturas de herança autossômica dominante (LGMD1).....	2
Tabela 2 – Distrofias musculares de cinturas de herança autossômica recessiva (LGMD2).....	3
Tabela 3 – Anticorpos primários usados no estudo.....	18
Tabela 4 – Sequência de oligonucleotídeos usados para a amplificação das regiões codificantes do gene <i>CAPN3</i>	20
Tabela 5 – Sequência de oligonucleotídeos usados para a amplificação da região codificante (exon 4) do gene <i>FKRP</i>	21
Tabela 6 – Características clínicas de pacientes diagnosticados com LGMD2A	26
Tabela 7 – Achados histológicos em pacientes com LGMD2A	27
Tabela 8 – Mutações, mudanças nos aminoácidos e consequência em pacientes com LGMD2A.....	32
Tabela 9 – Aspectos clínicos em pacientes com LGMD2I	35
Tabela 10 – Aspectos histológicos de pacientes diagnosticados com LGMD2I.....	36
Tabela 11 – Aspectos clínicos de pacientes com LGMD sem subtipo definido	39
Tabela 12 – Aspectos histológicos de pacientes com LGMD sem subtipo definido	42
Tabela 13 – Análise densitométrica da expressão proteica da CAPN3 e da disferlina no tecido muscular de pacientes com LGMD.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SG: alfa sarcoglicana
 γ -SG: gama sarcoglicana
ANO5: anoctamina 5
ATPase: adenosina trifosfatase
CAPN3: calpaína 3
CK: creatinoquinase
DAB: diaminobenzidina
DMD: distrofia muscular de Duchenne
FCMD: distrofia muscular de Fukuyama
FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FKRP: proteína relacionada à fukutina
GO: Tricômico de Gomori
HE: Hematoxilina & Eosina
IH: imunoistoquímica
LGMD: do inglês, *Limb Girdle Muscular Dystrophy*
LIM: Laboratório de investigação médica
MEB: do inglês Muscle-Eye-Brain Disease
MMII: membros inferiores
MMSS: membros superiores
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogenase
ORO: Oil red
PAS: Ácido periódico de Schiff
POMGnT1: Proteína orto-ligada manose beta1,2-N-acetil glucosaminiltransferase 1
POMT1: Proteína orto manosiltransferase 1
POMT2: Proteína orto manosiltransferase 2
SDH: Succinato desidrogenase
SDS-PAGE: do inglês, *Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis*
SGP: sarcoglicanopatias
TCLE: termo de consentimento livre esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. LGMD2A.....	4
1.2. Alfa-distroglicana (LGMD2I, 2K, 2M, 2N E 2O).....	5
1.3. Outras formas de LGMD	6
1.3.1. Sarcoglicanas	6
1.3.2. LGMD2B (disferlina)	6
1.3.3. Anoctamina (LGMD2L)	7
1.4. Proteínas musculares	7
1.4.1. Calpaína-3 (CAPN3).....	7
1.4.2. Proteína relacionada à fukutina (FKRP).....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS	13
4. METODOLOGIA.....	14
4.1. Pacientes e diagnóstico	14
4.1.1. Pacientes.....	14
4.1.2. Aspectos clínicos e diagnóstico laboratorial.....	14
4.2. Histologia.....	15
4.2.1. Cortes histológicos	15
4.2.2. Reações histológicas e histoquímicas	15
4.2.3. Reações imunohistoquímicas (Imunoperoxidase).....	16
4.3. Western blotting (WB).....	16
4.4. Pesquisa de mutações nos genes CAPN3 e FKRP	18
5. RESULTADOS	22
5.1. Pacientes.....	22
5.2. Calpainopatia (LGMD2A).....	25
5.2.1. Aspectos clínicos	25

5.2.2.	Aspectos histológicos	26
5.2.3.	Aspectos Moleculares.....	29
5.3.	FKRP (LGMD2I)	34
5.3.1.	Aspectos clínicos	34
5.3.2.	Aspectos histológicos	35
5.3.3.	Aspectos moleculares.....	37
5.4.	LGMD indeterminada.....	38
5.4.1.	Aspectos clínicos	38
5.4.2.	Aspectos histológicos	40
5.5.	Análise proteica	43
6.	DISCUSSÃO	47
7.	CONCLUSÕES	58
8.	ANEXOS	59
9.	REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Distrofias musculares compõem um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizadas por degeneração progressiva da musculatura esquelética (**Toniolo e Minettit, 1999; Dalkilic e Kunkel, 2003; Kanagawa e Toda, 2006**). São miopatias com grande heterogeneidade e variabilidade clínica, existindo desde formas muito graves, rapidamente progressivas, a formas leves com curso lentamente progressivo (**Vainzof e Zatz, 2003**).

As distrofias musculares de cinturas ou "*Limb-Girdle Muscular Dystrophies*" (LGMD) formam um grupo de miopatias de caráter progressivo com grande variabilidade clínica e genética. São miopatias em que a fraqueza muscular predomina nas porções proximais dos membros superiores e dos membros inferiores (**Bushby, 1995; Bonnemann, 2003; Vainzof e Zatz, 2003; Kirschner e Bonnemann, 2004**).

Muitos pacientes apresentam sintomatologia notada já no primeiro ano de vida; enquanto que outros, a maioria dos casos, inicia as manifestações após a primeira década de vida. Há também grande variabilidade quanto ao grau de comprometimento motor; alguns casos apresentam sintomatologia similar a distrofia muscular de Duchenne (DMD), enquanto outros evoluem durante a vida com fraqueza muscular levemente progressiva, mas com mínimo comprometimento das habilidades funcionais. Em praticamente todos os casos, o valor sérico da creatinoquinase (CK) encontra-se acima do limite superior da normalidade. O exame de biópsia muscular revela alterações distróficas inespecíficas e atualmente, por meio de experimentos de imunoistoquímica (IH) e de *Western blotting* (WB), é possível identificar o defeito proteico específico na maioria dos casos.

As formas de herança autossômica dominante constituem o tipo 1 (LGMD1) e as formas autossômicas recessivas, o tipo 2 (LGMD2). Pelo menos 29 genes já foram mapeados como responsáveis por diferentes formas de LGMD, sendo oito autossômicos dominantes (LGMD1A – G) e 21 autossômicos recessivos (LGMD2A – P). As formas de LGMD1 são bem mais raras tanto no Brasil quanto em outras partes do mundo, e são causadas principalmente pela deficiência da miotilina (LGMD1A) (**Speer et al., 1992; Hauser et al., 2000**),

lamina A/C (LGMD1B) (van der Kooi et al., 1997; Muchir et al., 2000; Worman e Bonne, 2007) e caveolina-3 (LGMD1C) (McNally et al., 1998; Minetti et al., 1998) (Tabela 1). No grupo LGMD2, que são mais frequentes, os tipos mais comuns são causados pela deficiência das proteínas calpaína-3 (LGMD2A), disferlina (LGMD2B), sarcoglicanas (alfa, beta, gama e delta) (LGMD2C a 2F), anoctamina-5 (LGMD2L) e FKRP (LGMD2I) (Bushby, 1999) (Tabela 2). As LGMD2I, 2K, 2M, 2N e 2O são denominadas alfa-distroglicanopatias devido a mutações que ocorrem em diferentes genes que codificam glicosiltransferases responsáveis pela glicosilação da alfa-distroglicana.

Tabela 1 – Distrofias musculares de cinturas de herança autossômica dominante (LGMD1)

LGMD1	Gene/locus	Proteína deficiente	Outras formas clínicas associadas
LGMD1A	<i>MYOT</i> /5q31	Miotilina	Miopatia miofibrilar
LGMD1B	<i>LMNA</i> /1q11-21	Lamina A/C	Distrofia muscular de Emery-Dreifuss; cardiomiopatia dilatada; DMC com deficiência de lamina A/C
LGMD1C	<i>CAV</i> /3p25	Caveolina-3	Miopatia “ <i>Rippling</i> ”; cardiomiopatia hipertrófica; elevação de CK
LGMD1D	<i>DES</i> /7q	Desmina	Cardiomiopatia dilatada e defeitos de condução cardíacos.
LGMD1E	<i>DNAJB6</i> /6q23	Proteína DNAJB6	Cardiomiopatia
LGMD1F	?/7q32	Transportin-3	-
LGMD1G	<i>HNRPD</i> L/4q21	HNRPD	-
LGMD1H	?/ 3p25.1-p23	?	-

DMC = distrofia muscular congênita

Tabela 2 – Distrofias musculares de cinturas de herança autossômica recessiva (LGMD2)

LGMD2	Gene/locus	Proteína deficiente	Formas clínicas associadas
LGMD2A	<i>CAPN3</i> /15q15	Calpaína-3	-
LGMD2B	<i>DYSF</i> /2p13	Disferlina	Miopatia distal de Miyoshi
LGMD2C	<i>SGCG</i> /13q12	Gama sarcoglicana	-
LGMD2D	<i>SGCA</i> /17q21	Afa sarcoglicana	-
LGMD2E	<i>SGCB</i> /4q12	Beta sarcoglicana	-
LGMD2F	<i>SGCD</i> /5q33	Delta sarcoglicana	-
LGMD2G	<i>TCAP</i> /17q12	Teletonina	-
LGMD2H	<i>TRIM32</i> /9q31	TRIM32	Miopatia sarcotubular
LGMD2I	<i>FKRP</i> /19q	FKRP	DMC tipo 1C
LGMD2J	<i>TTN</i> /2q24.2	Titina	Distrofia muscular dos tibiais (AD)
LGMD2K	<i>POMT1</i> /9q34	POMT1	DMC forma de Walker-Warburg
LGMD2L	<i>ANO5</i> /11p	Anoctamina 5	-
LGMD2M	<i>FKTN</i> /9q31	Fukutina	DMC forma de Fukuyama
LGMD2N	<i>POMT2</i> /14q24	POMT2	DMC forma de Walker-Warburg
LGMD2O	<i>POMGNT1</i> /1p34.1	Proteína O-mannose beta-1,2-N-acetilglucosaminiltransferase	-
LGMD2P	<i>DAG1</i> /3p21.31	Distroglicana (distroglicanopatia)	-
LGMD2Q	<i>PLEC1</i> /8q24.3	Plectina	Epidermólise bolhosa
LGMD2R	<i>Des</i> /2q35	Desmina	-
LGMD2S	<i>TRAPPC11</i> / 4q35.1	TRAPPC11	-
LGMD2T	<i>GMPPB</i> / 3p21.31	Beta subunit of GDP-mannose pyrophosphorylase	DMC forma de Walker-Warburg/ DMC relacionada a GMPPB
LGMD2U	<i>ISPD</i> / 7p21.2-p21.1	Isoprenoid synthase domain-containing protein	DMC forma de Walker-Warburg

DMC = distrofia muscular congênita

1.1. LGMD2A

A calpainopatia é caracterizada pela deficiência da proteína CAPN3 que é codificada por um gene localizado no *locus* 15q e foi descrita em diferentes regiões geográficas, inclusive no Brasil (**Passos-Bueno et al., 1999**). Esse tipo de distrofia de cinturas é a mais frequente em diferentes populações (**van der Kooi et al., 2007; Guglieri et al., 2008**). A taxa de ocorrência no Brasil coincide com a da LGMD2B causada por deficiência na disferlina (**Passos-Bueno et al., 1996**). Estudo realizado no nosso serviço mostrou que a forma LGMD2A corresponde a 15% das LGMD de início na infância (**Albuquerque et al., 2015**).

O curso da doença é lento e progressivo levando a perda da deambulação em aproximadamente uma ou duas décadas após o diagnóstico. Os músculos primariamente envolvidos são os glúteos e os adutores dos quadris e uma característica comum é a escápula alada (**Kramerova et al., 2007; Albuquerque et al., 2015**). São características comuns desse tipo de distrofia: simetria, atrofia muscular, preservação dos abdutores das coxas, comprometimento da musculatura abdominal, provocando uma marcha com hiperlordose e de base alargada. Precocemente ocorrem retrações dos tendões de Aquiles, podendo ocorrer também deformidades da coluna. Os níveis séricos de CK são frequentemente elevados.

A idade de início varia de dois aos 40 anos, mas a doença geralmente surge na segunda ou terceira década de vida, com o desenvolvimento de fraqueza proximal dos membros inferiores. Os casos de início precoce são geralmente mais severos, entretanto, existem casos de início tardio que envolve uma rápida progressão levando a perda para marcha por volta da terceira década de vida (**Zatz e Starling, 2005**).

Um estudo Brasileiro mostrou uma ampla variabilidade intrafamiliar e interfamiliar em 63 pacientes, com formas tanto brandas quanto severas. Aproximadamente 20% desses pacientes são confinados à cadeira de rodas antes dos 30 anos de idade (**Zatz et al., 2000**).

O diagnóstico é feito pela análise da expressão da CAPN3 no músculo esquelético por WB, entretanto, alguns pacientes apresentam quantidades

normais de CAPN3, porém com inatividade funcional da proteína. Dessa forma, há necessidade de estudo genético para estes casos.

1.2. Alfa-distroglicana (LGMD2I, 2K, 2M, 2N E 2O)

Todos os genes envolvidos nas alfa-distroglicanopatias (LGMD2I, 2K, 2M, 2N E 2O) codificam glicosiltransferases responsáveis pela glicosilação da alfa-distroglicana que é responsável pela ligação da beta-distroglicana, localizada na membrana plasmática, com proteínas específicas da matriz extracelular.

A LGMD2I é causada devido alterações que ocorrem na glicosiltransferase codificada pelo gene *FKRP* (*Fukutin related protein*), mapeado no *locus* 19q13.3 que também é responsável por causar uma forma de distrofia muscular congênita, a DMC1C (**Brockington et al., 2001a; Brockington et al., 2001b**). Apesar do curso da LGMD2I ser relativamente benigno, existe um espectro de gravidade clínica que depende da idade de início. Pacientes com início precoce, ou seja, nos primeiros anos de vida, tendem a mostrar um curso grave similar ao fenótipo da DMD, deixando de deambular no decorrer da segunda década (**Schwartz et al., 2005**). Distúrbio respiratório restritivo primário e envolvimento cardíaco têm sido relatados com diferentes formas e graus de intensidade. A hipertrofia muscular constitui um aspecto marcante, predomina nas panturrilhas, e pode afetar também coxas e língua (**Mercuri et al., 2003; Schwartz et al., 2005**). Pacientes com idade de início mais tardio mostram um fenótipo heterogêneo, também com hipertrofia muscular, podendo manter a marcha independente até a quinta década da vida. O nível sérico de CK é geralmente elevado.

A LGMD2K é causada por mutações no gene *POMT1* (*Protein-O-Mannosyl-transferase 1*) que também causa a síndrome de Walker-Warburg (**de Bernabé et al., 2002; Balci et al., 2005**). O gene da *fukutina* responsável pela distrofia muscular de Fukuyama, também é responsável por causar um tipo de distrofia de cintura, denominado LGMD2M que é associado com alterações clínicas ou estruturais do SNC. Tal anomalia decorre da intensa hipoglicosilação da alfa-distroglicana (**Godfrey et al., 2006**). As LGMD2N e 2O são causadas devido a mutações nos genes *POMT2* (*Protein-O-Mannosyl-transferase 2*) e

POMGnT1 (*Protein O-linked mannose beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase*), respectivamente, e também estão associadas com redução na glicosilação da alfa-distroglicana (**Biancheri et al., 2007; Clement et al., 2008**).

1.3. Outras formas de LGMD

1.3.1. Sarcoglicanas

As sarcoglicanopatias (SGP) são divididas em gama (LGMD2C), alfa (LGMD2D), beta (LGMD2E) e delta (LGMD2F) de acordo com os genes afetados que codificam cada uma das subunidades do complexo de sarcoglicanas que faz parte do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina na membrana da fibra muscular (**Bonnemann et al., 1995; Lim et al., 1995; Noguchi et al., 1995; Piccolo et al., 1995; McNally et al., 1996; Nigro et al., 1996**). Mutações primárias em qualquer um dos genes que codificam as subunidades do complexo de sarcoglicanas leva a perda total ou parcial da subunidade afetada, assim como deficiência secundária das outras subunidades do complexo e algumas vezes diminuição da expressão da distrofina no músculo (**Vainzof et al., 1996; Bushby et al., 1997; Jones et al., 1998; Vainzof et al., 1999; Ferreira et al., 2011**). Estudo realizado no nosso serviço mostrou que parte destes pacientes pode apresentar estabilização do quadro motor com uso de corticosteroides (**Albuquerque et al., 2014**).

1.3.2. LGMD2B (disferlina)

A proteína disferlina foi identificada simultaneamente por **Bashir et al. (1998)** e por **Liu et al. (1998)**, sendo que a sua deficiência primária é responsável por causar dois fenótipos distintos: a LGMD2B e a miopatia de Miyoshi. Recentemente, **Paradas et al. (2009)** identificaram uma forma de distrofia muscular congênita causada por mutações no gene da disferlina. A LGMD2B parece ser responsável por cerca de 30% das distrofias musculares progressivas em determinadas regiões geográficas, embora, em algumas regiões como a Índia e o Oriente Médio sejam raras. No Brasil são tão frequentes quanto à forma

LGMD2A (**Passos-Bueno et al., 1996**), e na Itália se apresenta como a segunda mais frequente (**Guglieri et al., 2008**).

1.3.3. Anoctamina (LGMD2L)

A LGMD2L foi descrita por **Jarry et al. (2007)**, sendo caracterizada por envolvimento assimétrico dos músculos quadríceps femoral e atrofia de bíceps braquial. É causada devido a mutações no gene *ANO5* que está localizado no *locus* 11p14 (**Bolduc et al., 2010**). A LGMD2L é considerada uma das formas mais comuns de distrofias de cinturas, especialmente de início após a segunda década de vida, rivalizando até mesmo com as formas LGMD2A e 2B (**Hicks et al., 2011; Pentilla et al., 2012**).

O fenótipo dos pacientes acometidos por esse tipo de distrofia é caracterizado pelo início exclusivamente na vida adulta, progressão lenta, atrofia assimétrica do quadríceps e bíceps braquial e nível de CK acima de dez vezes o limite superior da normalidade. Não tem sido relatado na literatura envolvimento significativo dos músculos cardíaco e respiratório (**Jarry et al., 2007; Bolduc et al., 2010; Hicks et al., 2011. Pentilla et al. (2012)** observaram diferenças fenotípicas relacionadas ao gênero dos pacientes. Enquanto os homens apresentavam o fenótipo característico, as mulheres não apresentaram nenhuma fraqueza muscular detectável clinicamente, apesar dos elevados níveis sérico de CK.

1.4. Proteínas musculares

1.4.1. Calpaína-3 (CAPN3)

As calpaínas são um grupo heterogêneo de cisteína-proteases não lisossomais cuja atividade é dependente de cálcio (**Goll et al., 2003**). Essas proteases estão envolvidas em uma variedade de processos celulares regulados por cálcio, tais como transdução de sinais, proliferação e diferenciação celular, apoptose e fusão de membranas (**Saez et al., 2006**).

Pelo menos 16 isoformas de calpaínas já foram identificadas, sendo que muitas delas estão envolvidas na patogênese de diversas doenças, como as

doenças de Alzheimer e de Huntington, catarata, câncer gástrico, diabetes, dentre outras (para uma revisão mais detalhada ver **Huang e Wang (2001)** e **Saez et al. (2006)**). Muitas dessas doenças ocorrem devido à superexpressão ou perda de função das calpaínas, tornando-as importantes alvos terapêuticos (**Saez et al., 2006**). A CAPN3 (ou p94) é a única isoforma dessa família de proteases que é específica do tecido muscular (**Sorimachi et al., 1989**), sendo que deficiência na sua expressão causa a forma de distrofia de cinturas LGMD2A (**Richard et al., 1995**).

O gene da CAPN3 humana, localizado no *locus* 15q15.1-q21.1, abrange uma região genômica de aproximadamente 138-kb, sendo formado por 24 éxons cujo produto primário produzido corresponde a um mRNA de 3316-bp que é expresso principalmente no músculo esquelético (**Sorimachi et al., 1989; Richard et al., 1995**). Além desse transcrito primário, diversos outros transcritos alternativos têm sido detectados em humanos, ratos, camundongos e coelhos, mas geralmente com um nível de expressão de 100 a 1000 vezes menor (**Herasse et al., 1999; Kawabata et al., 2003**).

A proteína CAPN3 é formada por 821 aminoácidos e pesa cerca de 94-kDa e assim como outras proteínas da família das calpaínas é composta de quatro domínios: o domínio I corresponde a uma curta região N-terminal, o domínio II (subdivido em IIa e IIb) corresponde à região proteolítica, o domínio III corresponde à uma região semelhante a C2 e o domínio IV que é a região de ligação ao cálcio (**Jia et al., 2001**). O que difere a CAPN3 das outras calpaínas é a presença de três sequências específicas: NS, que é uma sequência N-terminal composta de 20 a 30 aminoácidos codificados pelo éxon 1; IS1, que se encontra entre os subdomínios IIa e IIb originando uma sequência de 50 aminoácidos codificado pelo éxon 6; e IS2, sendo formado por 80 aminoácidos codificados pelos éxons 15 e 16 localizados entre os domínios III e IV (**Duguez et al., 2006**).

A CAPN3 é localizada tanto no citosol quanto no núcleo das células e necessita de níveis extremamente baixos de Ca^{2+} para sua ativação. No músculo esquelético se liga a determinadas regiões da proteína titina que parecem proporcionar uma estabilidade maior a CAPN3 e prevenir a sua proteólise (**Zatz**

e **Starling, 2005**). Estudos *in vitro* realizados por **Guyon et al. (2003)** demonstraram que a CAPN3 é capaz de clivar a filamina C e regular a sua interação com a gama e delta-sarcoglicanas. Diversas outras proteínas do citoesqueleto celular têm sido reportadas como substratos potenciais da CAPN3, através de experimentos *in vitro*, como as proteínas talina, vinexina e ezrina (**Taveau et al., 2003**).

Há evidências de que um dos substratos da CAPN3 é a proteína AHNAK que está envolvida na citoestrutura subsarcolemal e que também faz parte do complexo de reparo de membrana juntamente com a disferlina (**Huang et al., 2008**). Recentemente, **Hauerslev et al. (2012)** demonstraram que a CAPN3 é importante para a regeneração muscular durante o remodelamento dos sarcômeros. **Baghdiguian et al. (1999)** demonstraram que a deficiência de CAPN3 também é responsável por causar apoptose mionuclear e profundas perturbações nas vias de I κ B α /NF- κ B que levam a apoptose das células musculares. Acredita-se também que disfunção completa da CAPN3 leva a fenótipos mais severos de LGMD2A (**Hauerslev et al., 2012**).

Mutações no gene *CAPN3* são responsáveis por ocasionar a LGMD2A. Esse tipo de distrofia é causado devido à perda da atividade proteolítica da CAPN3 ao invés de defeitos estruturais ou hiperativação da mesma (**Richard et al., 2000**).

Desde o estudo realizado por **Richard et al. (1995)** em que foi determinado a organização genômica dos 24 éxons que compõem o gene *CAPN3* e que levaram a descobertas das primeiras mutações nesse gene, diversos outros estudos já foram realizados em diferentes populações, em busca de mutações no gene *CAPN3* (**Passos-Bueno et al., 1999; Richard et al., 1999; Chae et al., 2001; Pollitt et al., 2001; de Paula et al., 2002**).

Mais de 460 mutações patogênicas, cobrindo quase toda a extensão do gene *CAPN3*, tem sido identificadas nos últimos anos (*Leiden Muscular Dystrophy Pages*, <http://www.dmd.nl>). Todos os tipos de mutações já foram descritas, desde mutação de ponto que levam a códons de parada prematura, mutações *frameshift*, inserções/deleções, a mutações do tipo *missense* que

afetam a sequência primária das proteínas resultando frequentemente na perda da atividade proteolítica da CAPN3 (**Ono et al., 1998; Fanin et al., 2003**).

Com relação à distribuição das mutações no gene foi observado um “*hot spot*” de mutações no éxon 21 e uma grande quantidade de mutações *missense* no éxon 11 (**Richard et al., 1999**). Na população brasileira, **de Paula et al. (2002)** observaram que das 47 mutações identificadas cerca de 41 estavam concentradas em apenas seis éxons. A partir desses resultados os autores concluíram que, para fins de diagnóstico, a triagem desses seis éxons (1, 2, 4, 5, 11 e 22) permite a identificação de cerca de 80% dos alelos mutados. Usando esta estratégia, **Albuquerque et al (2015)** identificaram 6 casos de LGMD2A em um grupo de 39 crianças com LGMD.

Richard et al. (1999) realizaram um dos maiores estudos de identificação de mutações, onde foram analisadas 181 famílias de 19 países. Nesse estudo foram encontradas 97 mutações patogênicas, 12 polimorfismos e cinco variantes não classificadas, onde a maioria das mutações se apresentou como variantes particulares e algumas delas como mutações recorrentes. Das várias mutações recorrentes encontradas muitas delas são devidas a um efeito fundador, já que se encontram em grande quantidade em populações específicas, tais como a mutação R769Q que é encontrada na população Amish e famílias metropolitanas francesas, as mutações Y537X e A702V que são encontradas em famílias Turcas e famílias metropolitanas francesas, e a mutação 2362AG TCATCT em famílias Bascos e da Ilha de Réunion. Alguns estudos encontraram um alto número de mutações não recorrentes indicando que a maioria dessas mutações são novas (**Saenz et al., 2005; Krahn et al., 2006**).

Em muitas formas de distrofia de cinturas o diagnóstico pode ser feito através da análise IH na biópsia muscular, tal como na deficiência de sarcoglicanas, caveolina-3 e de disferlina. No entanto, na deficiência de CAPN3 não há até o momento anticorpos com especificidade suficiente para auxiliar no diagnóstico usando a técnica de IH. Dessa forma, a deficiência de CAPN3 nos casos de LGMD tem sido demonstrada através de WB. No entanto, algumas mutações no gene *CAPN3* causam alterações puramente funcionais, e não quantitativas, dando resultado falso negativo através deste método (**Fanin et al.,**

2009). Assim, a forma mais segura de confirmar o diagnóstico de LGMD2A é a pesquisa de mutações no gene *CAPN3*, especialmente naqueles casos em que a análise IH e/ou WB não foram capazes de definir a deficiência proteica específica.

1.4.2. Proteína relacionada à fukutina (FKRP)

O gene *FKRP* foi primeiramente mapeado por **Driss et al. (2000)** no locus 19q13.3 e posteriormente identificado por **Brockington et al. (2001b)** como um novo membro da família Fukutina de proteínas. Tal identificação se deu devido à homologia que esse gene possui com o gene da Fukutina, onde mutações no mesmo levam a uma doença com fraqueza muscular progressiva desde a infância associada com comprometimento do sistema nervoso central, denominada distrofia muscular congênita de Fukuyama (FCMD – do inglês *Fukuyama congenital muscular dystrophy*) (**Fukuyama et al., 1960**).

O gene *FKRP* compreende uma região genômica de aproximadamente 12-kb, sendo composto por quatro éxons, com o éxon 4 (de 3,8-kb) englobando toda a região codificante do gene (**Brockington et al., 2001b**).

Mutações nesse gene são responsáveis por causar LGMD2I e a distrofia congênita MDC1C. A MDC1C é uma condição mais severa com início nas primeiras semanas de vida levando a incapacidade para marcha, já a LGMD2I é uma condição mais branda apresentando um curso mais variado de manifestações, com início variando da primeira a terceira décadas de vida e uma progressão mais lenta, ambas sem comprometimento intelectual, mas com elevados níveis séricos de CK (**Brockington et al., 2001a; Brockington et al., 2001b**).

Acreditava-se que mutações no gene *FKRP* levavam somente a essas duas formas de distrofias, entretanto, **de Bernabé et al. (2004)** identificaram dois pacientes que apresentavam mutações nesse gene, com um quadro de distrofia muscular com severas malformações oculares e cerebrais. Dessa forma o espectro de doenças causadas por mutações no *FKRP* foi expandido, passando a incluir condições como a doença do músculo-olho-cérebro (MEB – do inglês *Muscle-Eye-Brain disease*) e a síndrome de Walker-Warburg.

2. JUSTIFICATIVA

Algumas das formas mais frequentes de distrofias musculares de cinturas podem ser identificadas através de análise da expressão proteica na biópsia muscular. No entanto, o diagnóstico para os subtipos LGMD2A e 2I é mais complexo que os demais. Uma das razões se dá ou pela indisponibilidade de anticorpos comerciais ou pela limitação da marcação pelas técnicas de IH. Apesar de ser possível realizar o diagnóstico de deficiência da CAPN3 através da análise proteica, é relatado na literatura que uma parte dos pacientes com mutação no gene *CAPN3* apresenta quantidades normais da proteína, tornando o diagnóstico ainda mais complexo (Fanin et al., 2009). Dessa forma, o método diagnóstico mais acurado desses subtipos de LGMD é através do estudo genético dos genes envolvidos nesses subtipos de distrofia de cinturas. Assim, pretende-se neste estudo, avaliar a presença de mutações nos genes da CAPN3 e do FKRP no nosso meio.

3. OBJETIVOS

1. Determinar a frequência de mutações nos genes *CAPN3* e *FKRP* em pacientes com distrofia muscular do tipo cinturas.
2. Determinar a expressão da *CAPN3*, através da técnica de WB, no músculo esquelético de pacientes com distrofias de cinturas e correlacionar com as mutações que forem encontradas no gene *CAPN3*.
3. Correlacionar as mutações encontradas com o quadro clínico e histológico dos pacientes.

4. METODOLOGIA

4.1. Pacientes e diagnóstico

4.1.1. Pacientes

Fizeram parte deste estudo pacientes com diagnóstico de distrofia muscular de cinturas, de ambos os sexos, em acompanhamento clínico no Ambulatório de Doenças Neuromusculares da Divisão de Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015. O diagnóstico para a distrofia muscular de cinturas foi realizado a partir da apresentação clínica, dosagem sérica de CK e achados provenientes da biópsia muscular dos pacientes. Todos os pacientes que participaram da pesquisa, ou responsáveis legais, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelo CAPPesq do HC-FMUSP número 128.420.

Os critérios de inclusão na pesquisa foram:

- Diagnóstico clínico e histológico de LGMD, com início das manifestações em qualquer idade.
- Biópsia muscular apresentando padrão miopático/distrófico com resultado normal para presença das proteínas distrofina, caveolina-3, sarcoglicanas e disferlina em análise por IH.

4.1.2. Aspectos clínicos e diagnóstico laboratorial

Rotineiramente, pacientes atendidos no ambulatório de Miopatias do HC-FMUSP com suspeita de miopatia são eventualmente submetidos à biópsia muscular como parte da investigação diagnóstica. Os fragmentos musculares das biópsias musculares são estocados no Laboratório de Biópsia Muscular, localizado no LIM15 (Laboratório de Investigação Médica 15) da FMUSP sendo, posteriormente, submetidos a uma série de reações histológicas de rotina, histoquímicas e IH complementares. Informações clínicas foram obtidas dos prontuários dos pacientes, tais como, idade de início das manifestações, tempo de doença, padrão de fraqueza muscular, história familiar, comprometimento

cardíaco e outros achados clínicos relevantes. Os valores da dosagem sérica de CK foram obtidos dos prontuários dos pacientes.

4.2. Histologia

4.2.1. Cortes histológicos

Imediatamente após sua remoção, os fragmentos musculares são montados em cortiça usando *Tissue Tek*, e são rapidamente congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e estocados a -80° C. Para montagem das lâminas os fragmentos musculares são submetidos a cortes sequenciais em posição coronal com espessura de corte entre 6 e 8 µm, realizado em criostato Leica CM3000, a uma temperatura de -25 °C. As lâminas são estocadas a -80 °C para uso posterior.

4.2.2. Reações histológicas e histoquímicas

As lâminas com os fragmentos musculares são submetidas às colorações histológicas de hematoxilina & eosina (HE), tricrômio de Gomori modificado (GO), ácido periódico de Schiff (PAS) e “oil red” O (ORO) que são úteis para avaliar o aspecto global da morfologia muscular, presença de infiltrado conjuntivo-gorduroso, necrose muscular e a presença de depósito de material PAS positivo e de gordura.

Com o intuito de avaliar o aspecto geral da arquitetura interna das fibras, a atividade oxidativa e a distribuição dos diferentes tipos de fibra, são realizadas de forma rotineira, respectivamente, as reações histoquímicas NADH tetrazolium redutase (NADH), succinato desidrogenase (SDH) e adenosina trifosfatase (ATPase) em diferentes pHs (9.4, 4.6 e 4.3).

As lâminas dos pacientes incluídos no estudo foram reavaliadas juntamente com o Prof. Dr. Edmar Zanoteli segundo os seguintes aspectos: variabilidade de tamanho das fibras, centralização nuclear, proliferação do tecido conectivo endomisial e perimisial, deposição de tecido adiposo, aspectos de degeneração e regeneração musculares, presença de reação inflamatória, alterações da atividade oxidativa, presença e fibras lobuladas e da distribuição

dos diferentes tipos de fibras. Muitos destes aspectos foram quantificados em normais (0), leves (+), moderados (++) e intensos (+++).

4.2.3. Reações imunohistoquímicas (Imunoperoxidase)

Para a realização da técnica de IH com peroxidase (imunoperoxidase), lâminas contendo secções musculares são incubadas com solução de bloqueio (0.1% BSA, 10% soro normal, 0.5% Tween em PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem em tampão de lavagem (0.1% BSA, 0.5% Tween em PBS), as lâminas são incubadas com anticorpo primário específico diluído em tampão de bloqueio por 1-3 horas em temperatura ambiente.

Após lavagem, os fragmentos são incubados com anticorpo secundário por 30 minutos em temperatura ambiente. Para a remoção de peroxidase endógena as lâminas são então mantidas em 0.1% de H₂O₂ em PBS por 30 minutos e posteriormente lavadas em tampão de lavagem. Procede-se assim com o método do complexo avidina biotina (ABC) e após lavagem, as lâminas são então expostas ao cromógeno diaminobenzidina (DAB), por 2 a 5 minutos, sendo a reação bloqueada com lavagem em água.

Posteriormente, as lâminas são contracoradas com hematoxilina, desidratadas em bateria de álcoois ascendente, lavadas em xilol e montadas em lamínulas com Entelan (Merck) para análise em microscópio óptico. Como controle interno, algumas lâminas são incubadas apenas com anticorpo secundário. Os anticorpos primários utilizados são apresentados na **Tabela 3**.

4.3. Western blotting (WB)

Os fragmentos musculares obtidos das biópsias já realizadas foram homogeneizados em 10 vezes o seu volume com tampão de extração contendo 1M Tris-HCl pH 6.4 e 8M Uréia. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 13000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante reservado para uso. Para a determinação da concentração das proteínas de cada amostra foi realizado o método de quantificação proposto por **Bradford (1976)**, usando-se albumina sérica bovina como curva de diluição padrão.

Após a determinação da concentração proteica das amostras, em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, aproximadamente 100 μg de proteínas foram transferidas para tubos novos e aquecidas a 95°C por 5 minutos para promover a sua desnaturação sendo em seguida mantidas no gelo até o uso. As amostras foram aplicadas ao gel de SDS-PAGE (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis*) (8%) juntamente com tampão da amostra (1M Tris-HCl pH 6.4, glicerol, 10% SDS, 8M Uréia, β mercaptoetanol, 0,1% de azul de bromofenol) e submetidas a eletroforese com voltagem de 100V, por 1 hora e 45 minutos, em aparato de eletroforese (BioRad). Após a corrida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose ou PVDF (voltagem de 200mA por 3 horas), e posteriormente, incubadas em tampão de bloqueio TBS-T (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl e 0.1% Tween 20), contendo 5% de leite desnatado, por pelo menos 1 hora em temperatura ambiente para bloquear sítios inespecíficos. Em seguida, as membranas foram incubadas em tampão de bloqueio contendo o anticorpo primário (Tabela 3) overnight à 4°C, de acordo com as instruções do fabricante. Procedeu-se então com 1 lavagem de TBST por 15 minutos, seguidas de 1 lavagem em tampão de bloqueio (leite 5%) por 15 minutos e 1 lavagem em TBT por 15 minutos para incubação de anticorpo secundário (diluído em TBST) conjugado com peroxidase (horseradish peroxidaseconjugated) anti-mouse IgG por aproximadamente 1 hora em temperatura ambiente. Após nova sequência de lavagens, 2 vezes por 15 minutos com TBS-T e 1 vez por 15 minutos com TBS, as membranas foram tratadas com reagente quimioluminescente (ECL-Amersham) para visualização das bandas de proteínas marcadas pelo complexo anticorpo primário/secundário. Para verificar a homogeneidade da transferência das amostras aplicadas, as membranas foram coradas com *Comassie*.

Tabela 3 – Anticorpos primários usados no estudo

Anticorpo	Clone	Empresa	Título	Uso
Distrofina (domínios C, N e central)	Dy4/6D3, Dy8/6C5, Dy10/12B2	Novocastra	1:20	IH
Disferlina	Ham1/7B6	Novocastra	1:20	IH, WB
Caveolina-3	Policlonal	Abcam	1:50	IH
Calpaína-3	Calp3c/12A2	Novocastra	1:20	WB
Calpaína-3	Calp3c/2C4	Novocastra	1:20	WB
Adalina	Ad1/20A6	Novocastra	1:20	IH
Gama-sarcoglicana	35DAG/21B5	Novocastra	1:20	IH
Delta-sarcoglicana	deltaSarc3/12C1	Novocastra	1:20	IH
Beta-sarcoglicana	betaSarc1/5B1	Novocastra	1:20	IH
Merosina (300k Da)	Mer3/22B2	Novocastra	1:100	IH

IH, imunistoquímica; WB, *Western blotting*.

4.4. Pesquisa de mutações nos genes *CAPN3* e *FKRP*

Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos à coleta de sangue periférico no Laboratório Central do HCFUSP, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O material coletado foi enviado para o LIM 45 onde foi realizada a extração de DNA através do método de precipitação com sal (Miller et al., 1988). A análise molecular dos genes *CAPN3* e *FKRP* foi realizada em todos os pacientes que apresentarem quadro sugestivo de distrofia muscular de cinturas e nos quais os procedimentos histológicos não permitiram definir a forma específica de distrofia muscular.

Inicialmente foram sequenciados os éxons em que são mais frequentes a ocorrência de mutações no gene *CAPN3* (Éxons 1, 2, 4, 5, 11 e 22). Caso não fosse identificadas mutações nesses éxons, os outros 18 éxons seriam sequenciados. Os éxons e regiões intrônicas adjacentes do gene *CAPN3* foram amplificados por PCR usando pares de oligonucleotídeos específicos e nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, seguido de temperatura de anelamento específica por 45 segundos e 72°C por um minuto, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os oligonucleotídeos usados para a amplificação do gene *CAPN3* estão apresentados na Tabela 4.

No caso do *FKRP* foi analisado o éxon 4, que corresponde a toda a região codificante do gene. Esse éxon foi amplificado por PCR usando os pares de oligonucleotídeos apresentados na Tabela 5. As condições para a reação de PCR são: um ciclo inicial de desnaturação (95°C por 4 minutos), seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, seguido de temperatura de anelamento de 60 °C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, com um passo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) com brometo de etídio para serem visualizados em luz ultravioleta (UV), e posteriormente foram purificados com a enzima Illustra ExoStar 1-Step (GE *Healthcare Life Sciences*). O Sequenciamento dos fragmentos amplificados foi realizado nas duas direções usando os mesmos pares de oligonucleotídeos das reações de PCR, no aparelho 3730 DNA *Analyzer* da *Applied Biosystems* (Foster City, CA) no Departamento de Endocrinologia da FMUSP (LIM25). A análise dos fragmentos seqüenciados foi realizada através de software Chromas 2.13 (Technelysium) e *Mutation Surveyor*.

As mutações encontradas foram comparadas com o banco de dados HGMD (*Human Gene Mutation Database*), mantido e atualizado online em <http://www.hgmd.org/> (**Stenson et al., 2009**).

Tabela 4 – Sequência de oligonucleotídeos usados para a amplificação das regiões codificantes do gene *CAPN3*

Éxon	Orientação	Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)
Éxon 1	<i>Foward</i>	TTTGCAGTTGCTTCCTTTC	488
	<i>Reverse</i>	GCAGGTGCTGAGTGAGAG	
Éxon 2	<i>Foward</i>	GCCAAGATTGCACCAAGT	279
	<i>Reverse</i>	GTCCCTTTACCTCCTGGAAG	
Éxon 3	<i>Foward</i>	CAGGAGGAGCAGGAGTGC	249
	<i>Reverse</i>	CAGCTTCTGGGAAAGTCAAGG	
Éxon 4	<i>Foward</i>	CTGAGGAATGTGGAGGAAGG	299
	<i>Reverse</i>	GCCTCTTCCTGTGAGTGAGG	
Éxon 5	<i>Foward</i>	ACATCACAGCATCCAAGAGG	353
	<i>Reverse</i>	AAAGCTCTATGCTGCCCTTC	
Éxon 6	<i>Foward</i>	CTCCCTTTGTCTGTCCCATC	338
	<i>Reverse</i>	GCTGCTGAGGGGAGTCTG	
Éxon 7	<i>Foward</i>	TTCAGGGAGCAGAGTGGTC	284
	<i>Reverse</i>	CCAACAGCTAAGTCCTGACTTC	
Éxon 8	<i>Foward</i>	AGCCCTCAGCAAGACAGAAG	229
	<i>Reverse</i>	GTTCCCAACACAGCCTTGTC	
Éxon 9	<i>Foward</i>	TTGGTAGTTACAGCAGCTGC	268
	<i>Reverse</i>	AGCTGGGACTGAGGTCTG	
Éxon 10	<i>Foward</i>	GTTAGTCCTGGGGTCTTCC	331
	<i>Reverse</i>	CTGGAACAGAGAGACTTAATAAGC	
Éxon 11	<i>Foward</i>	TAAATGGCTCCCTCTGTCTC	323
	<i>Reverse</i>	CTCTAGAAGCCCCTGGAAG	
Éxon 12	<i>Foward</i>	CTGCAGTTGCTGGCATTG	219
	<i>Reverse</i>	CAAGGCCCTCTCCTATCAC	
Éxon 13	<i>Foward</i>	AACTGTGACATGGGTTGAC	395
	<i>Reverse</i>	CTCATGCCTTCAACCTCT	
Éxon 14	<i>Foward</i>	TAGAGGCTGGTTCTGGCTTG	235
	<i>Reverse</i>	ATTCTCCCCTGCACCATCT	
Éxon 15	<i>Foward</i>	AAGACCAGGATACAGGGAAGC	211
	<i>Reverse</i>	GGTGCATGGATGCATATGAG	
Éxon 16	<i>Foward</i>	AAGCTGCTCCAAGAGAGGTG	278
	<i>Reverse</i>	AGCCCCTGTGTATCCCAAG	
Éxon 17	<i>Foward</i>	TAGGCACTTGGCTCCCTTG	250
	<i>Reverse</i>	TGAAATAATTGGTAATCTGAGC	
Éxon 18 e 19	<i>Foward</i>	GCCAGGTGGAATTTGTTTTG	383
	<i>Reverse</i>	TGACTGGGCACCCTGTATG	
Éxon 20 e 21	<i>Foward</i>	GGATTTTGCTGTGTGCTGTG	397
	<i>Reverse</i>	GTGAGAAGCCCTTTCCCTCTC	
Éxon 22	<i>Foward</i>	ACTTTCCCTTCCCAGGTC	284
	<i>Reverse</i>	AGATGCCTGTTGCCACAA	
Éxon 23	<i>Foward</i>	TGCTGATGAGGGACAGCAC	269
	<i>Reverse</i>	CACTGTGTGGAAATGAGGAGC	
Éxon 24	<i>Foward</i>	TCTTGCCCCGTAAGATTC	204
	<i>Reverse</i>	CTGCTGGGTCCTTTGAGG	

Tabela 5 – Sequência de oligonucleotídeos usados para a amplificação da região codificante (exon 4) do gene *FKRP*

Nome	Orientação	Oligonucleotídeos (5' –3')	Tamanho (pb)
Fragmento 1	<i>Foward</i>	TGGTTCTGACAATCAGCTGCT	274
	<i>Reverse</i>	CCGCGTTGTCAAATGCCTCGAA	
Fragmento 2	<i>Foward</i>	CCCGTGTACACCGTCCTGGTGC	332
	<i>Reverse</i>	CCCGTGTACACCGTCCTGGTGC	
Fragmento 3	<i>Foward</i>	GCGTCCCTCGCGCTCAGCCTTCCA	369
	<i>Reverse</i>	GCGTCCCTCGCGCTCAGCCTTCCA	
Fragmento 4	<i>Foward</i>	GCAGCTGCTGGACTTGACCTTCGC	348
	<i>Reverse</i>	CCCAGCAGTGAGCCGCCCTCGAG	
Fragmento 5	<i>Foward</i>	TGGAGGCTGCGGGCGTGCGCTACTG	257
	<i>Reverse</i>	CCACAGGTCCACGTGCAAGTGGT	
Fragmento 6	<i>Foward</i>	TTCCGCGTGCAGTACAGCGAAAGC	313
	<i>Reverse</i>	CCCGAAAAACAAAGGCGAGGTT	
Fragmento 7	<i>Foward</i>	TTCCGCGTGCAGTACAGCGAAAGC	339
	<i>Reverse</i>	AGAGCTTCTCCACATCCAGACA	

5. RESULTADOS

5.1. Pacientes

No período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015 foram avaliados, em pelo menos uma oportunidade, no Ambulatório de Miopatias, 89 pacientes com diagnóstico clínico de distrofia muscular de cinturas, incluindo adultos e crianças. Alguns destes casos já tinham estudo histológico muscular prévio, enquanto que outros foram submetidos posteriormente a biópsia muscular no decorrer do estudo como parte da investigação diagnóstica.

Através da realização de biópsia muscular, 24 tiveram o diagnóstico imunoistoquímico de deficiência primária de disferlina, nove de deficiência primária de sarcoglicanas, 12 de deficiência parcial de distrofina com diagnóstico final de distrofia muscular de Becker, e oito (meninas) de deficiência parcial de distrofina com diagnóstico final de portadora de distrofinopatia. Desta forma, 69 pacientes tiveram o diagnóstico de LGMD, enquanto que 20 tiveram o diagnóstico de distrofinopatia. Dentre o grupo de pacientes com LGMD, 36 pacientes não tiveram a determinação da deficiência proteica primária. Estes casos foram então incluídos no estudo genético para os genes *CAPN3* e/ou *FKRP* (Figura 1 e 2).

Ressalta-se aqui que pacientes do sexo masculino com quadro típico ou de DMD ou de distrofia muscular de Becker são rotineiramente submetidos a estudo genético para o gene da distrofina, antes da realização da biópsia muscular. Os casos negativos são então submetidos à biópsia muscular. Neste mesmo período, foram feitos 24 diagnósticos imunoistoquímicos de DMD, naqueles casos em que o estudo genético foi negativo.

Os 36 pacientes incluídos no estudo eram provenientes de 35 famílias, sendo que 22 (61%) eram do sexo feminino e 14 (39%) do sexo masculino. A média da idade dos pacientes foi de 34 anos e variou de 10 a 69 anos. Os dados clínicos são apresentados nas Tabelas 6, 9 e 11.

Dos 36 pacientes estudados, 9 (25%) tiveram o diagnóstico molecular e/ou proteico de calpainopatia (LGMD2A), seis (17%) de alfa-distroglicanopatia

com mutação no *FKRP* (LGMD2I) e em 21 (58%) deles não foi possível determinar o subtipo específico (LGMD indeterminada) (Figura 3).

Figura 1 – Proporção entre os diferentes subtipos de LGMD em um grupo de 89 pacientes

Figura 2 – Frequência de pacientes com deficiência primária nas proteínas disferlina e sarcoglicanas e com diagnóstico de calpainopatia e de FKRP em um grupo de 69 casos de LGMD

Figura 3 – Frequência de pacientes com LGMD2A e LGMD2I em um grupo de 36 casos de LGMD sem diagnóstico definido

5.2. Calpainopatia (LGMD2A)

5.2.1. Aspectos clínicos

Nove pacientes (25%) sendo sete do sexo feminino e dois do sexo masculino foram diagnosticados com LGMD2A através da identificação de mutações patogênicas no gene *CAPN3*, com exceção do caso 9 em que não foi realizada a pesquisa de mutações, mas foi feita análise da expressão proteica através da técnica de WB. Neste caso (paciente 9), o estudo genético não foi realizado pois o DNA não estava disponível para análise.

A média da idade dos pacientes foi de 26,3 anos, com idade de início variando dos três aos 23 anos de idade, onde os primeiros sintomas observados foram fraqueza de MMII (sete pacientes), quedas frequentes (três casos), dores musculares generalizadas (um paciente) e fraqueza de MMII e MMSS (um paciente). Com base na idade de início das manifestações os pacientes foram classificados em dois grupos: início precoce (< 12 anos) e início típico (idade entre 12 e 30 anos). Cerca de 56% dos pacientes com LGMD2A apresentaram início precoce dos sintomas e 44% início típico.

O padrão de envolvimento muscular em todos os pacientes apresentou um predomínio proximal sendo maior nos MMII, com exceção de um paciente (caso 7) em que o padrão de envolvimento foi igual nos MMII e MMSS. Com relação à evolução da doença, na maioria dos pacientes se apresentou como lentamente progressiva (cinco pacientes), seguida por estável em três pacientes e progressivo em um.

O nível sérico médio de CK de todos os pacientes com LGMD2A foi de 1876,7 U/L (variando de 166 a 7462 U/L), sendo que os valores referentes a dois pacientes não estavam disponíveis para análise. Em dois casos, os níveis se apresentaram dentro do nível de normalidade (casos 2 e 5) e em cinco pacientes (casos 3, 4, 7, 8 e 9) os níveis se apresentaram elevados, sendo que no caso 4 se mostrou 44 vezes acima do limite superior da normalidade (Tabela 6).

Tabela 6 – Características clínicas de pacientes diagnosticados com LGMD2A

Casos	Sexo/ idade	II	Sintoma inicial	Envolviment o muscular	Evolução	Outros	CK *
1	F/17	5	Quedas frequentes	Proximal MMII>MMSS	Estável	Fenótipo Emery- Dreifus/ RE	ND
2	F/45	12	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	HP/RE/ES	VN
3	F/33	23	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Progressiva	-	9x
4	F/12	3	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Lentamente Progressiva	RE/ EA/ ES	44x
5	M/22	15	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	HP/ EA	VN
6	F/22	11	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	-	ND
7	M/33	22	Quedas frequentes e fraqueza de MMII e MMSS	Proximal MMII=MMSS	Estável	EA	9x
8	F/38	8	Dor muscular generalizada e fraqueza de MMII	N Proximal MMII>MMSS	Estável	-	7x
9	F/15	8	Quedas frequentes e Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	EA	4x

II, idade de início; MMII, membros inferiores; MMSS, membros superiores; RE, retrações; HP, hipertrofia de panturrilhas; ES, escoliose; EA, escápula alada; VN, valor normal; ND, não disponível. *Nível sérico de CK dividido pelo valor do limite superior da normalidade.

5.2.2. Aspectos histológicos

As biópsias musculares de dois pacientes diagnosticados com LGMD2A não estavam disponíveis para análise (casos 7 e 8). A paciente 8 é irmã da paciente 3, e em casos de indivíduos da mesma família só foi realizada biópsia muscular em um dos membros. O paciente 7 tinha biópsia muscular realizada em outro serviço, e não tivemos acesso às lâminas. Não havia informação sobre análise imunoistoquímica.

O estudo histológico mostrou um padrão distrófico em todos os casos, sendo caracterizados por variabilidade no calibre das fibras associada com aumento do tecido conjuntivo endomisial e/ou perimisial e centralização nuclear. Não havia reação inflamatória em nenhum dos casos.

As biópsias musculares apresentaram padrão distrófico moderado na maioria dos pacientes (casos 1, 2, 3 e 6), grave em um paciente (caso 5) e leve

em dois paciente (casos 4 e 9). Outros achados encontrados incluíram fibras hipercontraídas (três pacientes) e fibras fendidas (*splitting*) (quatro pacientes). Em todos os pacientes havia falhas na atividade oxidativa. Fibras lobuladas foram observadas em cinco pacientes, sendo que em dois deles (casos 2 e 3) a quantidade dessas fibras foi considerada acentuada. Em apenas quatro casos (pacientes 1, 4, 5 e 9) foi observada a presença de necrose com reação macrofágica (Tabela 7) (Figura 4).

A técnica de IH mostrou marcação normal para a distrofina, merosina e caveolina-3 ao redor da membrana das fibras em todos os casos. Foi observada uma redução parcial da disferlina em três pacientes (casos 2, 3 e 5) (Figura 5).

Tabela 7 – Achados histológicos em pacientes com LGMD2A

Casos	VF	TC	CN	NE	FL	Atividade oxidativa	Outros	Disferlina	Padrão distrófico
1	++	++	+	++	raras	Falhas	<i>Splitting</i> , fibras hipercontraídas	Normal	Moderado
2	++	++	+	0	+++	Falhas	-	Parcial	Moderado
3	++	++	+	0	+++	Falhas	-	Parcial	Moderado
4	+	+	0	+	0	Falhas	<i>Splitting</i>	Normal	Leve
5	+++	+++	++	+	+	Falhas leve	<i>Splitting</i> , fibras hipercontraídas	Parcial	Grave
6	+	++	++		0	Falhas	<i>Splitting</i> , fibras hipercontraídas		Moderado
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	+	+	+	++	+	Falhas	-	-	Leve

VF, variação no calibre das fibras; TC, tecido conjuntivo; CN, centralização nuclear; FL, fibras lobuladas; 0, normal ou ausente; +, leve; ++, moderado; +++, grave; ND, não disponível

Figura 4 – Alterações histológicas na biópsia muscular de pacientes com LGMD2A. Aspecto distrófico moderado caracterizado por variação no tamanho das fibras, aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial e presença de fibras musculares em necrose (seta) em **A e B** (H&E) (paciente 1). Presença de grande número de fibras loluladas ao NADH em **C** (paciente 3), e alterações inespecíficas da citoarquitetura interna das fibras ao NADH, em **D** (paciente 6). Presença de *splitting* (seta preta) e necrose (seta branca) na reação para fosfatase ácida, em **E** (paciente 5), e aspecto distrófico moderado com a presença de fibra hipercontraída (seta) em **F** (tricrômio de Gomori) (paciente 6). Barra = 100µm.

Figura 5 – Marcação da proteína disferlina em um paciente com LGMD2A. Em **A** marcação normal e em **B** deficiência parcial, ambos referentes ao paciente 2.

5.2.3. Aspectos Moleculares

Foram encontradas um total de 21 variantes diferentes nos 36 pacientes estudados. Dessas 21 variantes, nove são mutações sabidamente patogênicas, oito são polimorfismos já conhecidos e quatro são mutações silenciosas (Figura 6).

As nove mutações patogênicas identificadas no estudo foram encontradas em oito pacientes, pertencentes a sete famílias. Cinco das mutações identificadas foram em heterozigose composta e duas em homozigose, e em um paciente foi encontrada apenas uma mutação (heterozigose) (Tabela 8). As mutações foram identificadas ao longo de todo o gene *CAPN3*, sendo todas previamente descritas e localizadas nos éxons 1 (c.258dupT), éxon 4 (c.506G>A, c.631A>G e c.550delA), éxon 2 (c.328C>T), éxon 11 (c.1468C>T), éxon 13 (1622G>A) e no éxon 22 (c.2306G>A e c.2362_2363delinsTCATCT) (Figura 7).

As mutações c.631G>A, c.328C>T e c.2362_2363delinsTCATCT tiveram uma maior frequência no estudo, sendo encontradas em dois pacientes cada uma. Todas as outras mutações foram encontradas em apenas um paciente cada. Com relação ao número de mutações encontradas por éxon, o éxon 4 foi o que apresentou o maior número com um total de três mutações, seguido pelo éxon 22 com duas e nos éxons 1, 2, 11 e 13 foram encontradas apenas uma mutação.

Os casos 3 e 8 pertencentes à mesma família, compartilharam a mesma mutação em heterozigose no éxon 4 (c.631A>G), entretanto, a mutação do outro alelo (c.506G>A) só foi identificada em uma delas (caso 3).

Com relação ao tipo de mutação, cinco são do tipo *missense* (c.506G>A, c.631A>G, c.1468C>T, c.1622G>A e c.2306G>A), três *frameshift* (c.258dupT, c.550delA e c.2362_2363delinsTCATCT) e uma mutação do tipo *nonsense* (c.328C>T). As mutações do tipo *missense* promovem a substituição dos aminoácidos codificados, sendo que: c.506G>A (p.R169H) promove a substituição do aminoácido arginina pelo aminoácido histidina na posição 169; c.631A>G (p.K211E) leva a troca de lisina na posição 211 por glutamato; c.1468C>T (p.R490W) a arginina é alterada para triptofano na posição 490; c.1622G>A (p.R541Q) que promove a alteração do aminoácido arginina por uma glutamina na posição 541; e c.2306G>A (p.R769Q) onde na posição 769 a arginina é alterada para glutamina.

As mutações *frameshift* promovem mudança no quadro de leitura dos códons levando a alterações significativas na sequência de aminoácidos com formação de uma proteína truncada. Na mutação c.258dupT (p.L87Sfs*4) há a formação de um novo *stop codon* na posição 4, devido a substituição de uma leucina por uma serina. A mutação c.550delA (p.T184Rfs*36) promove a mudança de uma treonina por uma arginina na posição 184 alterando o quadro de leitura e criando um novo *stop codon* na posição 36. Na mutação c.2362_2363delinsTCATCT a substituição de uma arginina por uma serina na posição 788 promove uma mudança no quadro de leitura promovendo a formação de um novo *stop codon* na posição 14 (p.R788Sfs*14).

A única mutação *nonsense* encontrada no estudo foi a c.328C>T no éxon 2. Essa substituição de citosina por uma timina promove a formação de um novo *stop codon* na posição 110 onde havia uma arginina (p.R110X). As mutações *nonsense* promovem uma parada abrupta na transcrição da proteína através da criação de um novo *stop codon*, gerando uma proteína truncada.

Os polimorfismos encontrados foram: c.18C>T, c.96C>T, c.78G>A no éxon 1; c.498+35G>T no éxon 3; c.606C>T no éxon 4; c.706G>A no éxon 5; c.1029+3A>G no éxon 7 e c.1014+30G>A no éxon 16. Todas essas variantes

foram classificadas como polimorfismos devido terem sido encontradas nos bancos de dados do TGP (1000 *Genomes Project*) e/ou EXAC (*Exome Aggregation Consortium*).

Quatro mutações, identificadas em dois pacientes, foram classificadas como mutações silenciosas pois codificam para os mesmos aminoácidos: c.495C>T (p.F165=) no éxon 3, c.984C>T (p.C328=) no éxon 7, c.930T>C (p.D310=) no éxon 6 e c.1350C>T (p.F450=) no éxon 10.

Figura 6 – Frequência das 21 variantes encontradas no gene *CAPN3* em 36 pacientes com LGMD

Tabela 8 – Mutações, mudanças nos aminoácidos e consequência em pacientes com LGMD2A

Caso	Éxon	Alelo 1/ Alelo2	AA	Tipo
1	22/ 22	c.2306G>A/ c.2306G>A	p.R769Q/ p.R769Q	Missense/ Missense
2	1/ 22	c.258dupT/ c.2362_2363delinsTCATCT	p.L87Sfs*4/ p.R788Sfs*14	Frameshift/ Frameshift
3	4/ 4	c.506G>A/ c.631A>G	p.R169H/ p.K211E	Missense/ Missense
4	2/ 22	c.328C>T/ c.2362_2363delinsTCATCT	p.R110X/ p.R788Sfs*14	Nonsense/ Frameshift
5	2/ 4	c.328C>/ c.550delA	p.R110X/ p.T184Rfs*36	Nonsense/ Frameshift
6	13/ 13	c.1622G>A/ c.1622G>A	p.R541Q/ p.R541Q	Missense/ Missense
7	2/ 11	c.328C>T/ c.1468C>T	p.R110X/ p.R490W	Nonsense/ Missense
8	4/ ?	c.631A>G/ ?	p.K211E/ ?	Missense/ ?

Figura 7 – Distribuição das mutações identificadas no estudo ao longo do gene *CAPN3*

5.3. FKRP (LGMD2I)

5.3.1. Aspectos clínicos

Seis (17%) dos 36 pacientes estudados apresentaram mutações patogênicas no gene *FKRP* e foram, portanto, diagnosticados com LGMD2I. Dos seis pacientes, cinco eram do sexo masculino e um do sexo feminino (Tabela 9).

Informações clínicas a partir dos prontuários foram obtidas em apenas cinco casos. Nestes cinco casos, a média de idade foi de 42,2 anos. A idade de início dos sintomas variou do primeiro ano de vida aos 38 anos (média de 27,6 anos), sendo que a maioria dos pacientes (quatro casos) apresentaram início tardio (acima de 30 anos). Quatro pacientes tiveram como primeiros sintomas fraqueza de MMII (casos 10, 11, 12 e 13) e um paciente apresentou quedas frequentes (caso 15). Somente dois pacientes (casos 11 e 15) apresentaram hipertrofia de panturrilhas, um paciente (caso 12) apresentou cardiomiopatia dilatada e outro paciente apresentou arritmia cardíaca e escápula alada (caso 13).

Todos os pacientes apresentaram um predomínio proximal sendo maior nos MMII. Somente um dos pacientes apresentou perda de deambulação (caso 13), apresentando um quadro rapidamente progressivo, outro caso se apresentou estável e a maioria apresentou uma evolução lentamente progressiva da doença (três casos). O nível sérico médio de CK nos cinco casos com informações disponíveis foi de 2375,8 U/L, variando de 1028 a 5013 U/L.

Tabela 9 – Aspectos clínicos em pacientes com LGMD2I

Casos	Sexo/ idade	II/ TD (anos)	Sintoma inicial	Envolvimento muscular	Evolução	Outros	CK*
10	M/45	38/7	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	-	6x
11	M/38	35/3	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	HP	10x
12	F/42	36/6	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	MD	29x
13	M/64	28/36	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Progressivo	EA/ AC	5x
14	M	ND	ND	ND	ND		ND
15	M/29	1/28	Quedas frequentes	Proximal MMII>MMSS	Estável	HP	13x

II, idade de início; TD, tempo de doença; MMII, membros inferiores; MMSS, membros superiores; HP, hipertrofia de panturrilhas; MD, miocardiopatia dilatada; AC, arritmia cardíaca; ND, não disponível. *Nível sérico de CK dividido pelo valor do limite superior da normalidade.

5.3.2. Aspectos histológicos

Todos os pacientes apresentaram um padrão distrófico característico, sendo quatro deles (casos 11, 12, 14 e 15) caracterizados por um padrão leve, em um (caso 13) por um padrão moderado e em um (caso 10) por um padrão grave (Tabela 10). O padrão distrófico nestes casos foi caracterizado por variabilidade no tamanho das fibras, aumento moderado do tecido perimisial e/ou endomisial, centralização nuclear e necrose com macrofagia (Figura 8). Não havia reação inflamatória em nenhum dos casos.

Dentre os outros achados importantes foram observadas fibras fendidas (*splitting*) em cinco casos, fibras anguladas atrofiadas em dois e a presença de sacos nucleares em um. Foi observada a ocorrência de necrose na biópsia de cinco pacientes, sendo de intensidade moderada em dois casos e leve em três. A presença de fibras lobuladas foi encontrada somente em um paciente (caso 10) e em pequena quantidade.

As proteínas distrofina, merosina e caveolina apresentaram marcação normal na técnica de IH em todos os casos. Foi observada redução leve na marcação da disferlina em um paciente (caso 12).

Tabela 10 – Aspectos histológicos de pacientes diagnosticados com LGMD2I

Casos	VF	TC	CN	NE	FL	Atividade oxidativa	Outros	Padrão distrófico
10	++	++	++	++	+	Falhas	<i>Splitting</i> , saco nuclear e fibras anguladas atrofiadas	Grave
11	+	+	++	+	0	Falhas	<i>Splitting</i>	Leve
12	+	+	+++	+	0	Falhas	<i>Splitting</i> e fibras anguladas atrofiadas	Leve
13	++	+	++	+	0	Falhas	<i>Splitting</i>	Moderado
14	+	+	+	++	0	Falhas	Fibras hipercontraídas	Leve
15	+	+	++	0	0	Falhas	<i>Splitting</i>	Leve

VF, variação no calibre das fibras; TC, tecido conjuntivo; CN, centralização nuclear; FL, fibras lobuladas; 0, normal ou ausente; +, leve; ++, moderado; +++, grave

Figura 8 – Alterações histológicas em pacientes com LGMD2I. Aspecto distrófico leve caracterizado por variação no tamanho das fibras, leve aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial e presença de fibras musculares atrofiadas e anguladas (seta) em **A** (H&E) (paciente 12). Em **B** nota-se a presença de sacos nucleares (seta preta) e fibras fendidas (seta branca) (H&E) (paciente 10). Alterações inespecíficas da citoarquitetura interna das fibras ao NADH em **C** (paciente 10). Presença de necrose com macrofagia na reação para fosfatase ácida em **D** (paciente 12). Barra = 100µm

5.3.3. Aspectos moleculares

Foram identificadas três variantes diferentes no gene *FKRP*, sendo que duas delas são sabidamente patogênicas e a outra uma mutação silenciosa. A mutação c.826C>A foi encontrada em 72% dos casos diagnosticados com LGMD2I, sendo encontrada em homozigose em todos. A substituição de uma citosina por uma adenina na posição 826 do cDNA promove a alteração do aminoácido leucina, no resíduo 276, pelo aminoácido isoleucina (p.L276I), sendo portanto, uma mutação do tipo *missense*.

A mutação c.822C>G é do tipo *missense* e foi identificada em heterozigose em um paciente (caso 13). A troca de uma citosina por uma guanina promove, na posição 274, a alteração de uma isoleucina por uma metionina (p.I274M). A variante c.585C>T, encontrada no mesmo paciente, promove a codificação do mesmo aminoácido na posição 195 (p.D195=) sendo caracterizada como uma mutação silenciosa.

5.4. LGMD indeterminada

5.4.1. Aspectos clínicos

Em 58% dos pacientes (21 casos) não foram encontradas mutações patogênicas nos genes *CAPN3* e *FKRP*, não tendo, portanto, chegado a um diagnóstico conclusivo. Apesar de não ter sido encontrada mutações nos genes estudados, esses pacientes apresentam um quadro clínico e histológico característico de distrofia muscular de cinturas e foram definidos como LGMD indeterminada.

Nesse subgrupo, cerca de 67% dos pacientes era do sexo feminino e 33% do sexo masculino. A média de idade foi de 36,6 anos com início do surgimento dos primeiros sintomas variando entre o primeiro ano de vida e os 58 anos (Tabela 11).

Com relação a progressão da doença, a maioria dos pacientes apresentava uma progressão lenta (13 casos), seguidos de pacientes que se encontram estáveis (cinco casos) e somente dois casos apresentava um caráter progressivo. Na maioria dos pacientes o padrão de envolvimento muscular apresentava caráter progressivo com predomínio dos MMII sobre os MMSS. O nível sérico de CK se mostrou elevado em quase todos os pacientes desse subgrupo com exceção de dois pacientes com valores dentro da normalidade (caso 18 e 27).

Tabela 11 – Aspectos clínicos de pacientes com LGMD sem subtipo definido

Casos	Sexo/idade	II/ TD (anos)	Sintoma inicial	Envolvimento muscular	Evolução	CK*
16	M/ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	M/15	2/13	Quedas frequentes e fraqueza nas pernas	Proximal MMII>MMSS	Estável	11x
18	F/54	35/15	Fraqueza nas pernas	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	VN
19	M/41	37/4	Disfagia, fraqueza nas pernas	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	23x
20	F/48	20/28	Fraqueza nas pernas	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	4x
21	F/34	6/28	Fraqueza nas pernas	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	7x
22	F/27	1/26	Quedas frequentes	Proximal MMII>MMSS	Progressiva	59x
23	F/42	34/8	Fraqueza nas pernas e nos braços	Proximal MMSS>MMII	Lentamente progressiva	5x
24	M/63	58/5	Fraqueza de MMII e MMSS	Proximal=distal; MMII=MMSS	Lentamente progressiva	35x
25	M/27	17/10	Fraqueza nas pernas	Proximal MMII=MMSS	Lentamente progressiva	98x
26	M/31	19/12	Dores musculares, fraqueza nas pernas, quedas frequentes	Proximal MMII>MMSS	Estável	74x
27	F/28	1/27	Hipotonia	Proximal MMII>MMSS	Estável	VN
28	F/69	ND	Fraqueza de MMII	Proximal MMSS>MMII	Lentamente progressiva	3x
29	M/62	43/19	Quedas frequentes e fraqueza nas pernas	Proximal MMII>MMSS	Estável	6x
30	F/42	ND	ND	Proximal MMII>MMSS	Estável	12x
31	F/47	37	Fraqueza de MMII	Proximal MMSS>MMII	Lentamente progressiva	41x
32	F/20	8/12	Quedas frequentes	Proximal MMII>MMSS	Progressiva	69x
33	F/26	11/15	Fraqueza de MMII	Proximal MMSS>MMII	Lentamente progressiva	65x
34	F/10	2/8	Quedas frequentes	Proximal MMII=MMSS	Lentamente progressiva	4x
35	F/21	8/13	Fraqueza de MMII	Proximal MMSS>MMII	Lentamente progressiva	3x
36	F/24	6/18	Fraqueza de MMII	Proximal MMII>MMSS	Lentamente progressiva	13x

II, idade de início; TD, tempo de doença; MMII, membros inferiores; MMSS, membros superiores; HP, hipertrofia de panturrilhas; MD, miocardiopatia dilatada; VN, valor normal; ND, não disponível. *Nível sérico de CK dividido pelo valor do limite superior da normalidade.

5.4.2. Aspectos histológicos

Todas as biópsias desse subgrupo apresentaram um padrão distrófico característico, sendo moderado na maioria dos pacientes (dez casos), leve em oito e grave em dois pacientes. Dentre outros achados importantes, observou-se a presença de fibras hipercontraídas em sete casos, *splitting* em seis e sacos nucleares em um. Foi observada também a presença de vacúolos marginados e fibras atrofiadas anguladas em um caso cada (Figura 9) (Tabela 12).

O paciente 23 tinha biópsia muscular realizada em outro serviço, e não tivemos acesso às lâminas. Não havia informação sobre análise imunoistoquímica.

Havia infiltrado perivascular leve em apenas um caso. O caso 22 apresentou um padrão distrófico moderado com a presença de degeneração miofibrilar, observando-se a presença de agregados proteicos, massas citoplasmáticas e vacúolos autofágicos.

As reações de IH mostraram marcação normal para as proteínas testadas (distrofina, merosina, caveolina-3 e sarcoglicanas). Apenas o caso 19 apresentava redução parcial na marcação para disferlina, nos demais a marcação foi normal.

Figura 9 – Alterações histológicas em pacientes com LGMD sem subtipo identificado. Aspecto distrófico moderado caracterizado por variação no tamanho das fibras e aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial em **A** (paciente 16) e **C** (paciente 20) (H&E). Em **B** (paciente 16) e **D** (paciente 20), nota-se a presença de alterações inespecíficas (falhas focais da atividade oxidativa) da citoarquitetura interna das fibras ao NADH. Barra = 100µm

Tabela 12 – Aspectos histológicos de pacientes com LGMD sem subtipo definido

Casos	VF	TC	CN	NE	FL	AO	Outros	PD
16	++	++	+	+	-	Falhas	Fibras hipercontraídas	Moderado
17	+	++	+	+	-	Falhas	<i>Splitting</i>	Moderado
18	++	++	+	+	++	Falhas	Fibras hipercontraídas	Moderado
19	+	+	+	+	-	Falhas	-	Leve
20	+	++	++	++	-	Falhas (minicor es)	<i>Splitting</i> , saco nuclear e fibras atrofiadas anguladas	Moderado
21	+++	+++	+	++	0	Falhas	Fibras hipercontraídas	Grave
22	++	++	+	0	0	Falhas	Agregados proteicos, MC e VA	Moderado (miofibrilar)
23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	++	++	+++	+	-	Falhas	Fibras SDH + e COX -, saco nuclear	Moderado
25	+	0	0	0	0	Ausente	Inflamação perivascular leve	Leve
26	+	+	+	+	0	Falhas	-	Leve
27	+++	++	+	+	0	Falhas	<i>Splitting</i> e fibras hipercontraídas	Moderado
28	++	++	+	+	0	Falhas	<i>Splitting</i>	Moderado
29	+++	+++	++	-	+++	Falhas	Vacúolos marginados	Grave
30	++	++	+	++	0	Falhas	<i>Splitting</i>	Moderado
31	+	0	0	0	0	Ausente	-	Leve
32	++	++	+	+	0	Falhas	-	Moderado
33	+	+	+	+	0	Falhas	Fibras hipercontraídas	Leve
34	++	++	+	+	0	Falhas	Fibras hipercontraídas	Leve
35	+	+	0	0	0	Falhas	<i>Splitting</i> e fibras hipercontraídas	Leve
36	+	+	+	+	0	Falhas	-	Leve

VF, variação no calibre das fibras; TC, tecido conjuntivo; CN, centralização nuclear; FL, fibras lobuladas; 0, normal ou ausente; +, leve; ++, moderado; +++, grave; AO, atividade oxidativa; PD, padrão distrófico; ND, não disponível; MC, Massas citoplasmáticas; VA, vacúolos autofágicos

5.5. Análise proteica

Foi feita análise da expressão das proteínas CAPN3 e disferlina nas biópsias musculares dos pacientes através da técnica de WB. Foram usados nesses experimentos biópsias de 14 pacientes. No restante dos pacientes não havia material suficiente para o estudo

Dois anticorpos diferentes estavam disponíveis para a marcação da CAPN3: Calp3d/2C4 e Calp3c/12A2. O anticorpo Calp3d/2C4 reconhece uma região entre os aminoácidos 1 a 19 dentro da proteína, gerando uma banda única de ~90 kDa mais uma banda adicional de degradação a ~30 kDa. O anticorpo Calp3c/12A2 se liga a região entre os aminoácidos 355 e 370, gerando uma banda de ~ 90 kDa mais uma série de bandas fracas a ~ 60 kDa. Dentre os dois anticorpos usados, o CALP12A2 apresentou os melhores resultados e foi utilizado em todas as biópsias disponíveis.

Para a marcação da disferlina foi usado o anticorpo Ham1/7B6 que reconhece uma única banda na altura de aproximadamente 237 kDa.

Como controle positivo foram usadas duas amostras de pacientes cujas biópsias musculares eram normais. Em todas as biópsias analisadas os controles apresentaram marcação normal tanto para a CAPN3 quanto para a disferlina.

Das 14 biópsias analisadas, cinco eram de pacientes com mutações patogênicas identificadas no gene *CAPN3* (LGMD2A), duas de pacientes com mutações no *FKRP* (LGMD2I) e sete de pacientes em que não foram encontradas mutações patogênicas em nenhum dos dois genes, com exceção do paciente 9 (caso 22) cujo DNA não permitiu a realização da análise genética (LGMD indeterminada).

Em todos os cinco casos com mutações patogênicas no gene CAPN3 (casos 1, 2, 3, 4 e 5) a quantidade da proteína CAPN3 estava ausente ou severamente reduzida, variando de 10 a 25% dos valores dos controles. Em três desses pacientes (casos 2, 3 e 4) foi observada redução parcial da disferlina (Tabela 13). É importante ressaltar que apesar do paciente 4 ter apresentado uma redução acentuada tanto da CAPN3 quanto da disferlina, tal fato se deve

provavelmente a menor quantidade de proteína dessa amostra em comparação as outras (Figura 10).

Os dois casos com LGMD2I (casos 11 e 12) apresentaram marcação normal tanto da CAPN3 quanto da disferlina.

Um dos pacientes do estudo (caso 9), cujo DNA estava com a qualidade ruim para a realização da análise genética, apresentou ausência total de marcação da CAPN3, sugerindo o diagnóstico de LGMD2A. No caso 22 em que foram identificadas duas mutações silenciosas no gene *CAPN3* houve aparente redução da marcação da proteína, porém não confirmada pela análise de densitometria, sugerindo que tais variantes não promovem uma alteração significativa da estrutura da mesma. Todos os cinco pacientes no grupo de LGMD indeterminada apresentaram marcação normal da proteína CAPN3, excluindo o diagnóstico de LGMD2A, uma vez que todo o gene havia sido triado para pesquisa de mutações. Um dos casos com LGMD indeterminada apresentou uma redução parcial da disferlina, apresentando cerca de 55% dos valores dos controles (caso 20).

Tabela 13 – Análise densitométrica da expressão proteica da CAPN3 e da disferlina no tecido muscular de pacientes com LGMD

Casos	Diagnóstico	Mutações	CAPN3 (94 kDa)	Disferlina (237 kDa)
1	LGMD2A	c.2306G>A/ c.2306G>A	20%	100%
2	LGMD2A	c.258dupT/ c.2362_2363delinsTCATCT	10%	30%
3	LGMD2A	c.506G>A/ c.631A>G	25%	70%
4	LGMD2A	c.328C>T/ c.2362_2363delinsTCATCT	20%	10%
5	LGMD2A	c.328C>/ c.550delA	20%	100%
9	LGMD2A	-	25%	100%
11	LGMD2I	c.826C>A/ c.826C>A	100%	100%
12	LGMD2I	c.826C>A/ c.826C>A	100%	100%
16	Indeterminada	-	100%	100%
17	Indeterminada	-	100%	100%
18	Indeterminada	-	100%	100%
19	Indeterminada	-	100%	90%
20	Indeterminada	-	100%	55%
22	Indeterminada	-	100%	100%

Figura 10 – WB das proteínas CAPN3 e disferlina em 14 pacientes com LGMD. **(A)** Pacientes com LGMD2A (casos 1, 2 e 3) e LGMDs indeterminadas (casos 16, 17, 18 e 20). **(B)** Pacientes com LGMD2A (casos 4, 5 e 9), LGMD2I (casos 11 e 12) e LGMDs indeterminadas (caso 19 e 22). A quantidade de proteína em cada linha foi normalizada usando a banda de MHC marcadas com comassie.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos que dentre 69 pacientes com quadro clínico e histológico de LGMD atendidos no nosso serviço no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015, 34,8% tinham deficiência de disferlina, 13% de sarcoglicanas, 13% de CAPN3 e 8,7% com mutação no *FKRP*. Estas proporções foram calculadas após a exclusão dos casos com deficiência de distrofina, em especial da distrofia muscular de Becker e das mulheres portadoras, aos quais clinicamente se apresentaram com quadro clínico de síndrome de cinturas.

Mesmo assim, uma proporção relativamente grande de pacientes com LGMD (30,4% de 69 pacientes) ainda permaneceram sem o diagnóstico específico, refletindo a ampla variedade genética da doença. Por outro lado, nosso estudo corrobora dados da literatura que demonstraram que em torno de 60 a 70% dos casos de LGMD são causados por deficiência de CAPN3, disferlina, sarcoglicana e *FKRP* (Zatz et al., 2000; Guglieri et al., 2008; Nigro et al., 2011).

Calpaínopatia (LGMD2A)

A LGMD2A é uma das formas de LGMD mais comuns representando cerca de 30 a 50% dos casos ao redor do mundo (Dinçer et al., 1997; Richard et al., 1997; de Paula et al., 2002; Piluso et al., 2005; Sáenz et al., 2005), sendo que no Brasil representam cerca de 30% dos casos conhecidos (Zatz et al., 2000). Foi observada uma frequência de 13% de casos com LGMD2A nos pacientes do presente estudo, sendo menor do que as frequências observadas em pacientes de outras etnias, como chinesa (23%) (Luo et al., 2011), japonesa (26%) (Chae et al., 2001) e turca (31,2%) (Balci et al., 2006).

Ambos os sexos foram acometidos, entretanto, foi observada uma preponderância do sexo feminino sobre o sexo masculino (3,5:1) fato que vai de encontro com o que é apresentado em outros estudos onde a proporção de homens sempre é mais alta que a de mulheres (Chae et al., 2001; Fanin et al., 2001; Pathak et al., 2010).

A média de idade de início dos sintomas nos pacientes com LGMD2A foi de 12 anos, sendo semelhante as médias encontradas por **Zatz et al. (2003)** e por **Saenz et al. (2005)** e um pouco abaixo da média encontrada em outros trabalhos (**Fanin et al., 2001; Pollitt et al., 2001; Groen et al., 2007; Pathak et al., 2010**).

O início dos sintomas foi precoce na maioria dos pacientes (56%), ocorrendo na primeira década de vida, diferentemente de outros estudos que demonstram que o início dos sintomas tende a ocorrer por volta de segunda década de vida (**Kramevora et al., 2007; Luo et al., 2011**).

O nível médio de CK foi de 1876,7 U/L (variando de 166 a 7462 U/L); valor semelhante aos encontrados por **Pathak et al. (2010)** e **Groen et al. (2007)**. Segundo **Pathak et al. (2010)**, elevados níveis séricos de CK são vistos particularmente no estágio ativo ou no início da doença, diminuindo com a progressão da mesma, embora, em muitos casos, possa permanecer alto em todos os estágios da doença.

O fenótipo de pacientes com LGMD2A é semelhante ao de outras formas de LGMD conhecidas. Tal característica indica que o estudo genético é extremamente importante para discriminar os diferentes subtipos e que em uma grande parte de pacientes com LGMD não determinada podem ocorrer mutações no gene *CAPN3* (**Piluso et al., 2005**).

Do ponto de vista histológico, o achado caracteristicamente associado a deficiência de *CAPN3* é a presença de fibras com aspecto lobulado nas reações oxidativas (**Ono et al., 1998; Chae et al., 2001; Albuquerque et al., 2015**). No nosso estudo, das sete biópsias disponíveis, em cinco havia fibras lobuladas em proporções variadas. No entanto, tais fibras não são patognomônicas de LGMD2A, já que são também identificadas em outras formas de LGMD, tal como observado no caso 10, que é na verdade uma LGMD2I. A presença de fibras hipercontraídas é uma característica marcante na biópsia muscular de pacientes com distrofinopatias, no entanto, tal alteração foi identificada em três dos casos com LGMD2A.

As mutações identificadas no presente estudo foram encontradas ao longo de todo o gene *CAPN3*, apesar de estudos iniciais sugerirem a presença

de um pequeno *hot spot* no éxon 21 (**Richard et al., 1999**). Estudos realizados em determinadas populações têm demonstrado uma maior frequência de mutações em determinados éxons. Fato este observado por **Groen et al. (2007)** que ao estudar uma população do Reino Unido, observou que 77,5% das mutações identificadas estavam localizadas nos éxons 1, 4, 5, 10, 11 e 17; e por **de Paula et al. (2002)** que ao estudar um grupo de pacientes brasileiros demonstrou que 87% das mutações estavam presentes nos éxons 1, 2, 4, 5, 11 e 22. Portanto, nessas populações, a triagem inicial desses éxons se mostra como uma estratégia interessante para a identificação das mutações. Usando esta estratégia, **Albuquerque et al. (2015)** identificaram seis casos de LGMD2A em um grupo de 39 crianças com LGMD.

A mutação c.2306G>A (p.R769Q) foi identificada no paciente 1, em homozigose no éxon 22, tendo já sido relatada na literatura (**Richard et al., 1995; de Paula et al., 2002; Krahn et al., 2006**). Tal mutação do tipo *missense* promove a substituição do aminoácido arginina pela glutamina no resíduo 769 da proteína. Essa mutação altera o domínio IV da proteína CAPN3, sendo este o sítio de ligação aos íons de Ca²⁺ (**Khorcid e Ikura, 2002**). Outro fator que corrobora para a patogenicidade da mesma foi a ausência total da proteína CAPN3 nas biópsias musculares desses pacientes.

No paciente 2 foram encontradas duas mutações patogênicas, c.258dupT/ p.L87Sfs*4 no éxon 1 (**Krahn et al., 2006; Groen et al., 2007**) e c.2362_2363delinsTCATCT/ p.R788Sfs*14 no éxon 22 (**Richard et al., 1995; Urtasun et al., 1998; de Paula et al., 2002; Krahn et al., 2006; Groen et al., 2007**). As duas mutações são do tipo *frameshift*, promovendo a mudança no quadro de leitura e a formação de novos *stop codons* nos resíduos 4 e 14, respectivamente. A mutação c.2362_2363delinsTCATCT é encontrada frequentemente em comunidades Bascas (**Urtasun et al., 1998**). Além dessas mutações patogênicas foram encontrado dois polimorfismos, um no éxon 5 (c.706G>A) e outro no íntron 7 (c.1029+3A>G).

No caso 3 foram encontradas duas mutações patogênicas no éxon 4, c.506G>A/p.R169H e c.631A>G/ p.K211E (**de Paula et al., 2002**). Ambas são mutações do tipo *missense* e promovem a alteração do aminoácido arginina por

histidina na posição 169 e a mudança do aminoácido lisina por glutamato no resíduo 211. Esse paciente apresentou ausência total da proteína CAPN3 e ausência parcial da Disferlina. O caso 8 é irmã do caso 3 e apresentou somente uma das mutações no éxon 4 (c.631A>G).

O paciente 4 apresentou a mutação nonsense c.328C>T/ p.R110X no éxon 2 (**Richard et al., 1999; Pollitt et al., 2001; de Paula et al., 2002; Piluso et al., 2005**) e uma mutação frameshift no éxon 22 (c.2362_2363delinsTCATCT/ p.R788Sfs*14). A mutação p.R110X promove a formação de um *stop codon*, levando a formação de uma proteína truncada. Essas duas mutações foram recorrentes em estudo realizado por **de Paula et al. (2002)**, correspondendo a cerca de 46% das famílias com LGMD, apesar da alta miscigenação da população brasileira. Tal estudo também sugeriu, através da análise de haplótipos, que essas duas mutações apresentam uma origem comum sugerindo efeito fundador.

No caso 5 foram encontradas as mutações c.550delA/ p.T184Rfs*36 no éxon 4 (**Richard et al., 1999; Pogoda et al., 2000**) e c.328C>T no éxon 2 (p.R110X). A mutação c.550delA é do tipo *frameshift* originando um novo códon de parada no resíduo 36 e alterando o quadro de leitura. Essa mutação tem sido reportada com alta frequência em diferentes populações, tais como: Croácia (**Canki-Klain et al., 2004**), Rússia (**Pogoda et al., 2000**), Turquia (**Dinçer et al., 1997**) e europeia (**Richard et al., 1999**). A alta frequência dessa mutação, aliada a análise de haplótipo realizada por diferentes autores (**Dinçer et al., 1997; Pogoda et al., 2000; Canki-Klain et al., 2004**), sugerem origem por efeito fundador.

A mutação c.1622G>A/ p.R541Q no éxon 13 foi encontrada em homozigose no caso 6, já tendo sido relatada na literatura (**Richard et al., 1999; Piluso et al., 2005**). Essa mutação do tipo *missense* altera o aminoácido arginina por glutamina no resíduo 541 da proteína.

No caso 7 foram identificadas as mutações (*nonsense*) c.328C>T/ p.R110X e c.1468C>T/ p.R490W (*missense*) no éxon 11 (**Richard et al., 1997; Chrobakova et al., 2004; Hermanova et al., 2005; Fanin et al., 2007; Nascimbeni et al., 2010**). A mutação c.1468C>T faz com que a enzima seja

mais dependente de Ca^{2+} e que demore mais para sofrer autólise, promovendo um comprometimento de sua função proteolítica **(Ono et al., 1998)**.

No caso 22 foram encontradas duas mutações de patogenicidade duvidosa: c.495C>T/ p.F165 no éxon 3 e c.984C>T/ p.C328 no éxon 7. Apesar de ambas as mutações serem silenciosas e não promoverem a mudança de aminoácidos, a quantidade da proteína CAPN3 nesse paciente se encontrava aparentemente reduzida no WB, mas não confirmado pela análise de densitometria, sugerindo que provavelmente tais variantes não possuem efeito deletério na estrutura da proteína **(Richard et al., 1995; Piluso et al., 2005; Saenz et al., 2005; Krahn et al., 2006)**.

No caso 31 foram identificadas uma mutação no éxon 6 (c.930C>T/ p.D310=) e outra no éxon 10 (c.1350C>T/ p.F450=). Essas duas mutações não promovem mudanças nos aminoácidos codificados, sendo portando silenciosas. Além dessas mutações, quatro polimorfismos foram identificados nesse paciente (c.96T>C; c.606T>C; c.706G>A e c.498+35G>T). Este paciente pode na verdade ter LGMD2A, já que: (1) O fato de que mutações silenciosas podem em alguns casos provocar alterações significativas na estrutura do gene podendo levar ao fenótipo clínico **(Richard e Beckmann, 1995)**; e (2) A presença de mutações silenciosas associadas com outras mutações localizadas em outros genes deve ser considerada como possíveis de induzir sintomas clínicos **(Eymard e Lévy, 2012)**. Infelizmente o paciente não tinha biópsia disponível para a realização dos experimentos do WB, o que poderia fortalecer ainda mais a patogenicidade nesse paciente.

As mutações c.258dupT e c.328C>T, localizadas respectivamente, nos éxons 1 e 2, foram identificadas em regiões que alteram o domínio I da proteína CAPN3. O domínio I compreende uma única alfa hélice ancorada em uma cavidade no domínio IV da proteína, e teria como função promover a estabilização do arranjo circular dos diferentes domínios da mesma **(Khorcid e Ikura, 2002)**.

As mutações c.1350C>T (éxon 10), c.1468C>T (éxon 11) e c.1622G>A (éxon 13) estão localizadas em regiões responsáveis pela formação do domínio III da proteína. O domínio III da CAPN3 tem uma topologia similar ao domínio C2

observadas em várias proteínas diferentes, sendo conhecida como um sítio de ligação aos íons CA^{2+} (Khorcid e Ikura, 2002).

Em vários estudos de triagem de mutações no gene *CAPN3* apenas um dos alelos mutados é identificado (Chou et al., 1999; Saenz et al., 2005; Groen et al., 2007). Tal fato foi observado em apenas um dos pacientes do presente estudo (caso 8), que apesar de ter uma irmã (caso 3) em que os dois alelos foram encontrados, não apresentou a mesma mutação.

Estudos iniciais demonstraram que a proteína CAPN3 não era detectável em músculos normais, sugerindo que a proteína sofria rapidamente autolise e consequentemente tinha uma meia vida curta, mesmo com a observação de elevados níveis de RNA (Sorimachi et al., 1993). Estudos subsequentes desenvolveram um anticorpo policlonal capaz de detectar a CAPN3 no músculo esquelético (tal anticorpo detectava também as CAPN1 e 2) (Spencer et al., 1997). Posteriormente, foram desenvolvidos anticorpos monoclonais para a marcação da CAPN3, entretanto, tais anticorpos funcionam unicamente em WB e não em IH (Anderson et al., 1998).

Os anticorpos desenvolvidos por Anderson et al. (1998) foram usados no presente estudo e dos 14 pacientes com biópsias disponíveis para a realização dos experimentos de WB, seis (42,8%) apresentaram redução da proteína CAPN3. Em todos esses pacientes foram encontradas mutações patogênicas. Diversos estudos têm demonstrado a redução da proteína CAPN3 em biópsias de pacientes com LGMDs indeterminadas (Fanin et al., 2001; Fanin et al., 2004; Pathak et al., 2010).

A identificação de redução intensa ou ausência de marcação da CAPN3 é um indicativo para o diagnóstico preciso de LGMD2A, uma vez que a probabilidade de encontrar mutações em um ou nos dois alelos é de cerca de 80% (Fanin et al., 2004; Fanin et al., 2009; Luo et al., 2012). Entretanto, é relatado que cerca de 20 a 30% dos pacientes com LGMD2A apresentam quantidades normais da CAPN3 (Fanin et al., 2003; Fanin et al., 2007; Groen et al., 2007; Milic et al., 2007), dessa forma, o padrão ouro na confirmação do diagnóstico de calpainopatia é através da demonstração de mutações ao longo do gene *CAPN3* (Bushby, 1999).

A amostra de DNA do caso 9 não permitiu a realização da análise genética, entretanto, a ausência total da marcação da proteína CAPN3 sugere que tal paciente seja um caso de LGMD2A.

No caso 4 foram encontradas duas mutações patogênicas no gene *CAPN3*, c.328C>T no éxon 2 e c.2362_2363delinsTCATCT no éxon 22, e apresentou ausência total tanto da disferlina quanto da CAPN3. Entretanto, a quantidade de proteína nessa amostra estava extremamente baixa (vide banda do MHC), o que explica a ausência total da disferlina. Algumas explicações podem ser apresentadas como: (1) A pouca quantidade de músculo disponível para a extração, ou (2) a presença de contaminantes ao redor dos blocos musculares anteriormente usados em secções e passados posteriormente para uso em WB que podem apresentar baixos resultados (**Bornemann e Anderson, 2000**).

FKRP (LGMD2I)

A LGMD2I representa cerca de 3 a 16% dos casos de LGMD2 em diferentes populações, como Austrália, Alemanha, Itália e Holanda (**Walter et al., 2004; Boito et al., 2005; van der Kooi et al., 2007; Lo et al., 2008; Magri et al., 2016**), sendo que no Brasil representa cerca de 10% dos casos (**de Paula et al., 2003**). Entretanto, em determinadas regiões da Europa essa forma tem sido relatada como a mais frequente, rivalizando com as formas de LGMD2A e LGMD2B, representando cerca de 26 a 37% dos casos (**Sveen et al., 2006; Stensland et al., 2011**). No presente estudo, a forma LGMD2I representou cerca de 8,7% dos casos de LGMD.

O padrão histológico observado nos nossos casos foi caracterizado por alterações distróficas de intensidade variável com a presença de sacos nucleares e necrose. Outro achado relativamente frequente foi a ocorrência de fibras atrofiadas anguladas. Tais alterações são similares às descritas em outros estudos (**Brockington et al., 2001a; Kang et al., 2007; Stensland et al., 2011**)

A mutação c.826C>A foi identificada em cerca de 80% dos casos de LGMD2I. Essa mutação tem sido relatada na literatura como a principal causa de LGMD2I em pacientes europeus e norte-americanos (**Brockington et al.,**

2001a; Walter et al., 2004; Sveen et al., 2006; Kang et al., 2007; Stensland et al., 2011), sendo que em determinadas regiões ela é a única mutação responsável por causar essa doença. Dessa forma, nessas populações, a triagem inicial do fragmento 4 do *FKRP* identificaria a maioria dos casos, sendo uma importante estratégia para a pesquisa de mutações nesse gene (**Sveen et al., 2006**).

Além da mutação c.826C>A foi encontrada outra mutação no paciente 14 (c.822C>G) associada com um polimorfismo já conhecido (c.585C>T). Diferentes mutações em pacientes com LGMD2I tem sido relatada na população brasileira, apesar da mutação c.826C>A ter sido a mais frequente (**de Paula et al., 2003**). Segundo **Hong et al. (2011)** a presença da mutação c.826C>A em pacientes de origem asiática não parece ser tão frequente quanto em outras populações.

Com relação aos aspectos clínicos, a LGMD2I tem sido associada com uma ampla variabilidade clínica; desde casos mais severos a casos mais brandos ou até mesmo assintomáticos (**Frosk et al., 2005**). Segundo **Boito et al. (2005)** a distribuição da fraqueza muscular é de predomínio proximal, acompanhada de atrofia dos membros e geralmente de hipertrofia de panturrilhas. No presente estudo, todos os pacientes apresentaram um padrão de fraqueza de predomínio proximal, associada com uma fraqueza maior de MMII correspondendo ao quadro relatado na literatura (**Liang et al., 2013; Bourteel et al., 2009**). Com relação a hipertrofia de panturrilhas, somente dois pacientes apresentaram essa característica.

A idade média dos pacientes foi de 42,2 anos, com idade de início variando do primeiro ano de vida aos 38 anos (média de 27,6 anos), sendo um pouco acima dos valores encontrados por **de Paula et al. (2003)** e muito acima da média relatada na literatura (**Boito et al., 2005; Bourteel et al., 2009; Liang et al., 2013**).

Pacientes com a mutação c.826C>A em homozigose geralmente apresentam um fenótipo mais leve do que os pacientes heterozigotos para a mesma mutação (**Poppe et al., 2003; Sveen et al., 2006; Stensland et al., 2011**). Pacientes com duas mutações *missense*, além da c.826C>A, também

apresentam geralmente um curso mais brando enquanto heterozigotos compostos para mutações nulas em um alelo associada com mutação *missense* no outro alelo geralmente tem um curso mais severo **(Sveen et al., 2006)**. Também é relatado que nos pacientes com fenótipo mais severo a doença tende a surgir nos primeiros anos de vida, ao passo que em quadros mais leves tende a ter um início mais tardio com um curso relativamente benigno **(Brockington et al., 2001b)**.

A maioria dos pacientes com a mutação c.826C>A identificados no estudo eram homozigotos e apresentaram um quadro clínico mais leve, com os primeiros sintomas surgindo somente na terceira década de vida. Entretanto, o paciente 13 apresentou um quadro clínico mais severo que os demais com perda da capacidade de deambular quatro anos após o início dos sintomas, evidenciando uma ampla variabilidade clínica nos pacientes com a mutação c.826C>A em homozigose **(Stensland et al., 2011)**.

Tem sido relatado que pacientes com mutações nulas em um alelo também apresentam um fenótipo mais severo **(de Paula et al., 2003)**, sendo que nenhum paciente com duas mutações nulas foi relatado até o momento, sugerindo que tal quadro pode ser incompatível com a sobrevivência **(Bushby e Beckmann, 2003)**.

Diversos estudos têm demonstrado a presença de envolvimento cardíaco em pacientes com LGMD2I, variando de 10 a 55% dos casos dependendo do método usado para avaliar a disfunção cardíaca **(Mercuri et al., 2003; Poppe et al., 2003; Walter et al., 2004)**. Outra característica clínica bastante comum é a presença de insuficiência respiratória, sendo que esses pacientes apresentam um quadro clínico mais severo **(Mercuri et al., 2003; Stensland et al., 2011)**. No estudo, a paciente 12 apresentou um quadro de insuficiência respiratória associada com cardiomiopatia dilatada, apresentando um quadro mais severo que os demais; e o paciente 13 apresentou um quadro de arritmia cardíaca.

Apesar da mioglobulinúria/rabdomiólise ter sido relatada como um sintoma frequente em pacientes com LGMD2I com mutação c.826C>A em homozigose **(Sveen et al., 2006)**, nenhum dos pacientes do nosso estudos apresentou esse problema.

Schwartz et al. (2005) demonstraram que alguns casos de pacientes com quadro clínico sugestivo de distrofinopatia, mas sem mutações identificadas, são na verdade casos de LGMD2I. Isso se deve ao fato que pacientes com LGMD2I e distrofinopatias compartilham muitas características clínicas tais como hipertrofia da língua e das panturrilhas, elevados níveis de CK e alterações distróficas na biópsia muscular. Por outro lado, alguns pacientes com suspeita de LGMD podem na verdade ser pacientes com distrofinopatias, tal como observamos no nosso estudo, em que identificamos 20 casos de distrofia muscular de Becker ou mulheres portadoras no grupo de pacientes com diagnóstico inicial de LGMD (**Sveen et al., 2006**).

LGMD indeterminada

Dentre os casos com a forma indeterminada há certamente uma grande variabilidade genética, sugerindo que o uso de ferramentas modernas de estudo genético tais como, sequenciamento em larga escala, deve ser extremamente útil na investigação destes casos (**Ghaoui et al., 2015; Kuhn et al., 2016; Magri et al., 2016**). Neste grupo, tanto achados clínicos quanto histológicos podem sugerir algum grupo de miopatia, ou mesmo de diagnósticos diferenciais. Por exemplo, a presença de alterações miofibrilares e massas citoplasmáticas, tal como observado no caso 22, ocorre nas formas autossômicas dominantes da LGMD e nas miopatias miofibrilares.

A presença de alterações mitocondriais, tal como observado no caso 24, embora possa ocorrer na LGMD, deve direcionar a investigação para as miopatias mitocondriais. A ocorrência de inflamação perivascular (caso 25), embora possa estar presente em diferentes formas de distrofias musculares, deve levantar a suspeita de doença reumatológica de base, tais como polimiosite, dermatomiosite e síndrome anti-sintetase. E finalmente, a ocorrência de vacúolos marginados (caso 29), sem reação inflamatória associada, é usualmente observada nas miopatias distais.

Em todos os casos de LGMD indeterminadas em que foram feitas análise da expressão proteica, apresentaram quantidades normais da CAPN3. Somente um caso (paciente 20) apresentou redução parcial da disferlina. Redução

secundária dessa proteína tem sido relatada em diferentes formas de LGMD (**Eymard e Lévy, 2012**).

Em conclusão, a abordagem usada neste estudo para o diagnóstico molecular das LGMD, pode ser extremamente útil para o diagnóstico de boa parte dos casos. No entanto, estudos genéticos mais abrangentes são necessários, já que há uma grande variabilidade genética nesta condição. Também é fundamental a caracterização do fenótipo clínico e histológico no sentido de direcionar o estudo genético.

7. CONCLUSÕES

Levando-se em consideração os 69 casos de pacientes com LGMD diagnosticados, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015, no Ambulatório de Miopatias, a frequência de mutações patogênicas no gene *CAPN3* foi de 13% e a de mutações no gene *FKRP* foi de 8,7%.

As mutações patogênicas no gene *CAPN3* foram identificadas ao longo de todo o gene, todas previamente descritas, sendo cinco do tipo missense (c.506G>A, c.631A>G, c.1468C>T, c.1622G>A e c.2306G>A), três frameshift (c.258dupT, c.550delA e c.2362_2363delinsTCATCT) e uma do tipo nonsense (c.328C>T). Dos nove pacientes com LGMD2A sete são do sexo feminino e dois do sexo masculino, com idade do início dos sintomas variando dos três aos 23 anos de idade.

Foram identificadas três mutações no gene *FKRP*, sendo que a mutação c.826C>A foi encontrada na grande maioria dos pacientes (72% dos casos). Em todos os casos com essa mutação elas foram encontradas em homozigose. Dos seis pacientes com LGMD2I, cinco eram do sexo masculino e um do sexo feminino, apresentando idade de início dos sintomas variando do primeiro ano de vida aos 38 anos.

Nos cinco casos com mutações patogênicas no gene *CAPN3* que apresentavam biópsias musculares disponíveis para análise, a quantidade dessa proteína estava ausente ou severamente reduzida, variando de 10 a 25% dos valores observados nos casos controles.

8. ANEXOS

Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Análise molecular e expressão protéica em pacientes com distrofia muscular tipo cinturas.**

2. PESQUISADOR: Edmar Zanoteli

CARGO/FUNÇÃO: médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM-SP: 68120

UNIDADE DO HCFMUSP: Neurologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO -

RISCO BAIXO -

RISCO MAIOR -

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Neste documento explicamos o estudo que estamos realizando com os pacientes portadores de distrofia muscular tipo cinturas. Por favor, leia até o fim, para decidir se você aceita participar do estudo.

As Distrofias Musculares compõem um grupo amplo de doenças genéticas que cursam com degeneração muscular ocasionando fraqueza e atrofia muscular. O diagnóstico é feito pela biópsia muscular, exame a qual seu filho (a) ou você já foi submetido, onde podemos analisar diversas proteínas musculares que são potenciais causadoras da doença. Nos pacientes com diagnóstico clínico e histológico de distrofia muscular de cinturas temos ainda a oportunidade de realizar estudo genético através da análise do DNA para alguns genes que mais frequentemente causam a doença, como por exemplo, os genes das proteínas calpaína-3, do FKRP, da anoctamina 5, das sarcoglicanas, entre outros.

Neste estudo temos como objetivo tentar identificar, através de testes genéticos, as mutações que causam distrofia muscular tipo cinturas nos pacientes diagnosticados com esta doença e saber se essas mutações foram herdadas dos pais ou são exclusivas dos pacientes. Conhecer as mutações permitirá no futuro melhorar o diagnóstico dos pacientes com distrofias musculares como um todo, orientar os pais dos pacientes com esta doença quanto ao prognóstico (chance de a doença de seus filhos permanecer estável, melhorar ou piorar) e os tratamentos preventivos adequados.

No entanto, é importante informar que não há um benefício imediato para o paciente incluído no estudo, exceto pela possibilidade de saber se a mutação foi realmente herdada dos pais, o que pode ajudar, a saber, o risco de que novos filhos do casal possam ter a mesma doença. O tratamento e acompanhamento dos pacientes serão o mesmo, estando eles incluídos no estudo ou não.

Após consulta médica realizada no ambulatório de Doenças Neuromusculares do Departamento de Neurologia da FMUSP, você e/ou seu filho (a) (s) terão a opção de serem submetidos a coleta de sangue para extração do DNA caso aceitem participar do estudo. O paciente e seus pais serão encaminhados para a coleta de sangue periférico de uma veia do antebraço. A amostra de sangue de cada um, no total de 5 a 10 ml (uma seringa pequena), será armazenada nos laboratórios do Hospital das Clínicas e usada posteriormente para os testes genéticos. A coleta não é diferente dos "exames de sangue" feitos normalmente nos laboratórios de hospitais e clínicas. Normalmente, a coleta é realizada apenas uma vez, porque a quantidade de sangue coletada é suficiente para uma grande quantidade de testes genéticos. Em algumas raras situações,

poderemos vir a solicitar uma nova coleta de sangue caso testes adicionais sejam necessários.

Os resultados dos testes genéticos, tão logo sejam completados, serão informados aos responsáveis pelo paciente, caso seja de seu interesse, com o objetivo de aconselhamento genético (informação do risco de que novos filhos possam apresentar a doença).

É importante salientar que não será necessária a repetição da biópsia muscular, que necessariamente já foi realizada para que o paciente tenha tido o diagnóstico de distrofia muscular de cinturas. Caso seja necessária realizar novas análises de biópsia, serão aproveitados os fragmentos de músculo já armazenados.

Em qualquer etapa do estudo, o Sr (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Edmar Zanoteli que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr.Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Cerqueira César, São Paulo, Prédio dos Ambulatórios, 6º andar, telefone (11) 30696000, ramal 6341 e na sua sala 5131, quinto andar do Instituto Central, telefone (11) 30697878, das 7 às 16 horas de 2ª a 5ª feira e às 6ªs feiras das 7 às 12 horas.** Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas pelos pesquisadores em conjunto com aquelas de todos os demais pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

O Sr (a) tem o direito de ser mantido (a) atualizado (a) sobre os resultados parciais e finais da pesquisa, que neste caso corresponde ao diagnóstico do tipo de distrofia muscular. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise molecular e expressão proteica em pacientes com distrofia muscular tipo cinturas”.

Discuti com o Dr Edmar Zanoteli sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Fica claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo B – Aprovação Pelo Comitê de Ética e Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

‘DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo molecular e da expressão de proteínas musculares na distrofia muscular de cinturas

Pesquisador: Edmar Zanoteli

Área Temática: Versão: 1

CAAE: 08125712.9.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 128.420

Data da Relatoria: 03/10/2012

Apresentação do Projeto:

As distrofias musculares compõem um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizadas por degeneração progressiva da musculatura esquelética. As formas mais comuns são causadas pela deficiência da proteína distrofina (distrofias musculares de Duchenne e de Becker). Outras formas de distrofias musculares progressivas são as distrofias musculares de cinturas ou limb girdle muscular dystrophy (LGMD), as quais são causadas por mutações em uma grande variedade de proteínas musculares, podendo ser herdadas de forma autossômica dominante ou recessiva. O diagnóstico é feito pelo exame de biópsia muscular que mostra um padrão histológico distrófico, ao lado de deficiência específica de proteínas musculares. Os principais tipos de LGMD são causados pela deficiência de calpaína-3, disferlina, anoctamina-5, sarcoglicanas e de FKRP. Em alguns subtipos de LGMD não é possível fazer o diagnóstico específico pela biópsia muscular, tais como na deficiência da calpaína-3, da anoctamina5 e do FKRP. Nestes casos, portanto, o exame molecular é de grande valor para a confirmação do diagnóstico.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é o de analisar os genes da calpaína-3, da anoctamina-5 e do FKRP em pacientes com diagnóstico histológico de LGMD. Espera-se ao final

do estudo determinar a frequência de mutações nestes genes na nossa população e poder correlacionar os achados clínicos e histológicos com as mutações encontradas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há benefícios imediatos ao paciente e os riscos envolvidos são mínimos, referentes apenas à coleta de sangue periférico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é interessante, está bem escrito e os pesquisadores apresentam as condições para executá-lo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo está em condições de ser aprovado na Cappesq.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 23 de Outubro de 2012

Assinado por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

9. REFERÊNCIAS

Albuquerque MA, Abath Neto O, da Silva FM, Zanoteli E, Reed UC. Limb-girdle muscular dystrophy type 2A in Brazilian children. *Arq Neuropsiquiatr*. 2015; 73(12): 993-7.

Albuquerque MA, Abath-Neto O, Maximino JR, Chadi G, Zanoteli E, Reed UC. Clinical aspects of patients with sarcoglycanopathies under steroids therapy. *Arq Neuropsiquiatr*. 2014; 72(10): 768-72.

Anderson LV, Davison K, Moss JA, Richard I, Fardeau M, Tomé FM, Hübner C, Lasa A, Colomer J, Beckmann JS. Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Am J Pathol*. 1998; 153(4): 1169-79.

Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J, Anderson LVB, De Munain AL, Fardeau M, Mangeat P, Beckmann JS, Lefranc G. Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med*. 1999; 5(5): 503-11.

Balci B, Aurino S, Haliloglu G, Talim B, Erdem S, Akcören Z, Tan E, Caglar M, Richard I, Nigro V, Topaloglu H, Dincer P. Calpain-3 mutations in Turkey. *Eur J Pediatr*. 2006; 165(5): 293-8.

Balci B, Uyanik G, Dincer P, Gross C, Willer T, Talim B, Haliloglu G, Kale G, Hehr U, Winkler J, Topaloglu H. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscul Disord*. 2005; 15: 271–75.

Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno

MR, de Sa Moreira E, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nature Genet.* 1998; 20: 37–42.

Beltran-Valero de Bernabé D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, Herrmann R, Sperner J, Korenke C, Diesen C, Dobyns WB, Brunner HG, van Bokhoven H, Muntoni F. Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker–Warburg syndrome. *J Med Genet.* 2004; 41: e61

Biancheri R, Falace A, Tessa A, Pedemonte M, Scapolan S, Cassandrini D, Aiello C, Rossi A, Broda P, Zara F, Santorelli FM, Minetti C, Bruno C.. POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363:1033-37.

Boito CA, Melacini P, Vianello A, Prandini P, Gavassini BF, Bagattin A, Siciliano G, Angelini C, Pegoraro E. Clinical and molecular characterization of patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Arch Neurol.* 2005; 62(12): 1894-9.

Bolduc V, Marlow G, Boycot KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, et al. Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86 :213-21.

Bonnemann, CG. The limb girdle muscular dystrophies. In: *Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence: A Clinician's Approach*, Jones, HR, De Vivo, DC, Darras, BT (Eds), Butterworth-Heinemann, Philadelphia 2003: p.717.

Bornemann A, Anderson LV. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. *Brain Pathol.* 2000; 10(2): 193-214.

Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, McNally EM, Duggan DJ, Angelini C, Hoffman EP. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat. Genet.* 1995; 11:266–273.

Bourteel H, Vermersch P, Cuisset JM, Maurage CA, Laforet P, Richard P, Stojkovic T. Clinical and mutational spectrum of limb-girdle muscular dystrophy type 2I in 11 French patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009; 80(12): 1405-8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 7(72): 248-54.

Brockington M, Blake DJ, Prandini P et al: Mutations in the fukutin-related protein gene C (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin $\alpha 2$ deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet.* 2001b; 69: 1198-1209.

Brockington M, Yuka Y, Pradini P, et al: mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol genet.* 2001a; 10: 2851-2859.

Bushby KM. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: report of the ENMC Consortium on Limb-Girdle Dystrophies. *Neuromuscu Disord.* 1995; 5:71.

Bushby KMD. The limb-girdle muscular dystrophies—multiple genes, multiple mechanisms. *Human Molecular Genetics.* 1999; 8(10) 1875–1882.

Bushby K, Anderson LVB, Sewry C, Pogue R, Taylor JA, Pollitt C, Muntoni F. Dystrophinopathy or sarcoglycanopathy—the importance of a full diagnostic assessment in suspected manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* 1997; 34:54.

Bushby KM, Beckmann JS. The 105th ENMC sponsored workshop: pathogenesis in the non-sarcoglycan limb-girdle muscular dystrophies, Naarden, April 12-14, 2002. *Neuromuscul Disord.* 2003; 13(1): 80-90.

Canki-Klain N, Milic A, Kovac B, Trlaja A, Grgicevic D, Zurak N, Fardeau M, Leturcq F, Kaplan JC, Urtizberea JA, Politano L, Piluso G, Feingold J. Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. *Am J Med Genet.* 2004; 125A(2): 152-6.

Chae J, Minamia N, Jina Y, Nakagawaa M, Murayamaa K, Igarashia F, Nonakaa I. Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders.* 2001; 11: 547-555.

Chou FL, Angelini C, Daentl D, Garcia C, Greco C, Hausmanowa- Petruszewicz I, Fidzianska A, Wessel H, Hoffman EP. Calpain III mutation analysis of a heterogeneous limb-girdle muscular dystrophy population. *Neurology.* 1999; 52: 1015–1020

Clement EM, Godfrey C, Tan J, Brockington M, Torelli S, Feng L, Brown SC, Jimenez-Mallebrera C, Sewey CA, Longman C, Mein R, Abbs S, Vajsar J, Schachter H, Muntoni F. Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Arch Neurol.* 2008 Jan; 65(1): 137-41.

Chrobáková T, Hermanová M, Kroupová I, Vondráček P, Maríková T, Mazanec R, Zámecník J, Stanek J, Havlová M, Fajkusová L. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord.* 2004; 14(10): 659-65.

Dalkilic I & Kunkel LM. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2003; 13:231-238.

de Bernabé, DB-V, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki A-E, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H, Brunner HG. Mutations in the O-Mannosyltransferase Gene POMT1 Give Rise to the Severe Neuronal Migration Disorder Walker-Warburg Syndrome. *Am J Hum. Genet.* 2002; 71:1033–1043.

de Paula F, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RCM, Matioli SR, Anderson LVB, Nigro V, Zatz M. Clinical variability in calpainopathy: What makes the difference? *European Journal of Human Genetics*. 2002; 10: 825 – 832.

de Paula F, Vieira N, Starling A, Yamamoto LU, Lima B, de Cássia Pavanello R, Vainzof M, Nigro V, Zatz M. Asymptomatic carriers for homozygous novel mutations in the FKRP gene: the other end of the spectrum. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11(12): 923-30.

Dinçer P, Leturcq F, Richard I, Piccolo F, Yalnizoglu D, de Toma C, Akçören Z, Broux O, Deburgrave N, Brenguier L, Roudaut C, Urtizberea JA, Jung D, Tan E, Jeanpierre M, Campbell KP, Kaplan JC, Beckmann JS, Topaloglu H. A biochemical, genetic, and clinical survey of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies in Turkey. *Ann Neurol.* 1997; 42(2): 222-9.

Driss A, Amouri R, Ben Hamida C, Souilem S, Gouider-Khouja N, Ben Hamida M, et al. A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscul Disord.* 2000; 10(4-5): 240-6.

Duguez S, Bartoli M, Richard I. Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS Journal*. 2006; 273: 3427–3436.

Eymard B, Lévy N. Diagnostic strategy for limb-girdle muscular dystrophies. *Rev Neurol (Paris)*. 2012; 168(12): 919-26.

Fanin M, Fulizio L, Nascimbeni AC, Spinazzi M, Piluso G, Ventriglia VM, Ruzza G, Siciliano G, Trevisan CP, Politano L, Nigro V, Angelini C. Molecular diagnosis in LGMD2A: mutation analysis or protein testing? *Hum Mutat*. 2004; 24(1): 52-62.

Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C. Screening of calpain-3 autolytic activity in LGMD muscle: a functional map of CAPN3 gene mutations. *J Med Genet*. 2007; 44(1): 38-43.

Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Trevisan CP, Meznaric-Petrusa M, Angelini C. Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am. J. Pathol*. 2003; 163: 1929–1936.

Fanin M, Nascimbeni AC, Tasca E, Angelini C. How to tackle the diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17: 598–603.

Fanin M, Pegoraro E, Matsuda-Asada C, Brown RH Jr, Angelini C. Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle dystrophy and myopathy. *Neurology*. 2001; 56(5): 660-5.

Ferreira AF, Carvalho MS, Resende MB, Wakamatsu A, Reed UC, Marie SK. Phenotypic and immunohistochemical characterization of sarcoglycanopathies. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66(10): 1713-9.

Frosk P, Greenberg CR, Tennese AA, Lamont R, Nylén E, Hirst C, Frappier D, Roslin NM, Zaik M, Bushby K, Straub V, Zatz M, de Paula F, Morgan K, Fujiwara

TM, Wrogemann K. The most common mutation in FKRP causing Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2I (LGMD2I) may have occurred only once and is present in Hutterites and other populations. *Hum Mutat.* 2005; 25: 38–44

Fukuyama Y, Kawazura M, Haruna H. A peculiar form of congenital progressive muscular dystrophy: report of fifteen cases. *Paediatr Univ Tokyo.* 1960; 4: 5–8.

Ghaoui R, Cooper ST, Lek M, Jones K, Corbett A, Reddel SW, Needham M, Liang C, Waddell LB, Nicholson G, O'Grady G, Kaur S, Ong R, Davis M, Sue CM, Laing NG, North KN, MacArthur DG, Clarke NF. Use of Whole-Exome Sequencing for Diagnosis of Limb-Girdle Muscular Dystrophy: Outcomes and Lessons Learned. *JAMA Neurol.* 2015; 72(12): 1424-32.

Godfrey C, Escolar D, Brockington M, Clement EM, Mein R, Jimenez-Mallebrera C, Torelli S, Feng L, Brown SC, Sewry CA, Rutherford M, Shapira Y, Abbs S, Muntoni F. Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2006; 60: 603-10.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W & Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003; 83: 731–801.

Groen EJ, Charlton R, Barresi R, Anderson LV, Eagle M, Hudson J, Koref MS, Straub V, Bushby KM. Analysis of the UK diagnostic strategy for limb girdle muscular dystrophy 2A. *Brain.* 2007; 130: 3237-49.

Guglieri M, Magri F, D'Angelo MG, Prella A, Morandi L, Rodolico C, Cagliani R, Mora M, Fortunato F, Bordoni A, Del Bo R, Ghezzi S. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy. *Hum Mutat.* 2008; 29: 258-66.

Guyon JR, Kudryashova E, Potts A, Dalkilic I, Brosius MA, Thompson TG, Beckmann JS, Kunkel LM, Spencer MJ. Calpain 3 cleaves filamin C and

regulates its ability to interact with delta e gama sarcoglycans. *Muscle & Nerve*. 2003; 28: 472–483.

Hauerslev S, Sveen M-L, Duno M, Angelini C, Vissing J, Krag TO. Calpain 3 is important for muscle regeneration: Evidence from patients with limb girdle muscular dystrophies. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2012; 13: 43.

Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, Tim RW, Taivainen A, Bartoloni L, Gilchrist JM, Stajich JM, Gaskell PC, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA, Carpen O, Westbrook CA, Speer MC. Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genetics*. 2000; 9(14):2141–2147.

Herasse M, Ono Y, Fougerousse F, Kimura E, Stockholm D, Beley C, Montarras D, Pinset C, Sorimachi H, Suzuki K, et al. Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 4047–4055.

Hermanová M, Zapletalová E, Sedláčková J, Chrobáková T, Letocha O, Kroupová I, Zámečník J, Vondráček P, Mazanec R, Maríková T, Vohánka S, Fajkusová L. Analysis of histopathologic and molecular pathologic findings in Czech LGMD2A patients. *Muscle Nerve*. 2006; 33(3): 424-32.

Hicks D, Sarkozy A, Muelas N, Koehler K, Huebner A, Hudson G, Chinnery PF, Barresi R, Eagle M, Polvikoski T, Bailey G, Miller J, Radunovic A, Hughes PJ, Roberts R, Krause S, Walter MC, Laval SH, Straub V, Lochmuller H, Bushby K. A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb girdle muscular dystrophy. *Brain*. 2011; 134: 171–182

Hong D, Zhang W, Wang W, Wang Z, Yuan Y. Asian patients with limb girdle muscular dystrophy 2I (LGMD2I). *J Clin Neurosci*. 2011; 18(4): 494-9.

Huang Y, De Moree A, Van Remoortere A, Bushby K, Frants RR, Dunnen JT, Van Der Maarel S. Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 2008; 17: 1855-1866.

Huang Y, Wang KKW. The calpain family and human disease. *TRENDS in Molecular Medicine.* 2001; 7(8): 355-362.

Jarry J, Rioux MF, Bolduc V, Robitaille Y, Khoury V, Thiffault L, et al. A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12. *Brain.* 2007; 130 :368-80.

Jia Z, Petrounevitch V, Wong A, Moldoveanu T, Davies PL, Elce JS & Beckmann JS. Mutations in calpain 3 associated with limb girdle muscular dystrophy: analysis by molecular modeling and by mutation in m-calpain. *Biophys J.* 2001; 80: 2590–2596.

Jones KJ, Kim SS, North KN. Abnormalities of dystrophin, the sarcoglycans, and laminin $\alpha 2$ in the muscular dystrophies. *J. Med. Genet.* 1998; 35: 379–386.

Kanagawa M & Toda T. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell–matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet.* 2006; 51: 915–926.

Kang PB, Feener CA, Estrella E, Thorne M, White AJ, Darras BT, Amato AA, Kunkel LM. LGMD2I in a North American population. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007; 8:115.

Kawabata Y, Hata S, Ono Y, Ito Y, Suzuki K, Abe K & Sorimachi H. Newly identified exons encoding novel variants of p94 / calpain 3 are expressed ubiquitously and overlap the alpha-glucosidase C gene. *FEBS Lett.* 2003; 555: 623–630.

Khorchid A, Ikura M. How calpain is activated by calcium. *Nat Struct Biol.* 2002; 9(4): 239-41.

Kirschner, J, Bonnemann, CG. The congenital and limb-girdle muscular dystrophies: sharpening the focus, blurring the boundaries. *Arch Neurol.* 2004; 61:189.

Krahn M, Lopez de Munain A, Streichenberger N et al. CAPN3 mutations in patients with idiopathic eosinophilic myositis. *Ann Neurol.* 2006; 59: 905–911.

Kramerova I, Beckmann JS, Spencer MJ. Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A). *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007; 128–144.

Kuhn M, Gläser D, Joshi PR, Zierz S, Wenninger S, Schoser B, Deschauer M. Utility of a next-generation sequencing-based gene panel investigation in German patients with genetically unclassified limb-girdle muscular dystrophy. *J Neurol.* 2016; 263(4): 743-50.

Liang WC, Hayashi YK, Ogawa M, Wang CH, Huang WT, Nishino I, Jong YJ. Limb-girdle muscular dystrophy type 2I is not rare in Taiwan. *Neuromuscul Disord.* 2013; 23(8): 675-81.

Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamand V, Meyer J, Richard I, Moomaw C, Slaughter C, et al. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat. Genet.* 1995; 11:257–265.

Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Ben Hamida M, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in

Miyoshimyopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature Genet.* 1998; 21: 31–36.

Lo HP, Cooper ST, Evesson FJ, Seto JT, Chiotis M, Tay V, Compton AG, Cairns AG, Corbett A, MacArthur DG, Yang N, Reardon K, North KN. Limb-girdle muscular dystrophy: diagnostic evaluation, frequency and clues to pathogenesis. *Neuromuscul Disord.* 2008; 18(1): 34-44.

Luo SS, Xi JY, Lu JH, Zhao CB, Zhu WH, Lin J, Wang Y, Ren HM, Yin B, Andoni UJ. Clinical and pathological features in 15 Chinese patients with calpainopathy. *Muscle Nerve.* 2011; 43(3) :402-9.

Luo SS, Xi JY, Zhu WH, Zhao CB, Lu JH, Lin J, Wang Y, Lu J, Qiao K. Genetic variability and clinical spectrum of Chinese patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Muscle Nerve.* 2012; 46(5): 723-9.

Magri F, Nigro V, Angelini C, Mongini T, Mora M, Moroni I, Toscano A, D'Angelo MG, Tomelleri G, Siciliano G, Ricci G, Bruno C, Corti S, Musumeci O, Tasca G, Ricci E, Monforte M, Sciacco M, Fiorillo C, Gandossini S, Minetti C, Morandi L, Savarese M, Di Fruscio G, Semplicini C, Pegoraro E, Govoni A, Brusa R, Del Bo R, Ronchi D, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. The Italian LGMD registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis. *Muscle Nerve.* 2016.

McNally EM, De Sá Moreira E, Duggan DJ, Bönnemann CG, Lisanti MP, Lidov HGW, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Hoffman EP, Zatz M, Kunkel LM. Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1998;7(5):871-7.

McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bonnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, Lidov HG, Noguchi S, Ozawa E, Finkel RS, et al. Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5:1841–1847.

Mercuri E, Brockington M, Straub V, Quijano-Roy S, Yuva Y, Herrmann R, Brown SC, Torelli S, Dubowitz V, Blake DJ, Romero NB, Estournet B, Sewry CA, Guicheney P, Voit T, Muntoni F. Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann Neurol.* 2000; 53:537–542.

Milic A, Daniele N, Lochmüller H, Mora M, Comi GP, Moggio M, Noulet F, Walter MC, Morandi L, Poupiot J, Roudaut C, Bittner RE, Bartoli M, Richard I. A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an in vitro assay. *Neuromuscul Disord.* 2007; 17(2): 148-56.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215.

Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bicarelli FD, Lisanti MP, Zara F. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1998; 18(4):365-8.

Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, Schwartz K. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Human Molecular Genetics.* 2000; 9(9): 1453–1459.

Nascimbeni AC, Fanin M, Tasca E, Angelini C. Transcriptional and translational effects of intronic CAPN3 gene mutations. *Hum Mutat.* 2010; 31(9): 1658-69.

Nigro V, Aurino S, Piluso G. Limb girdle muscular dystrophies: update on genetic diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol.* 2011; 24(5): 429-36.

Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz, M. Autosomal recessive limb-girdle muscular

dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat. Genet.* 1996; 14:195–198.

Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH, et al. Mutations in the dystrophin-associated protein gammasarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science.* 1995; 270:819–822.

Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, Richard I, Saido TC, Beckmann JS, Ishiura S, Suzuki S. Functional defects of a musclespecific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A, *J. Biol. Chem.* 1998; 17073–17078.

Paradas C, Gonzalez-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, Garcia-Consuegra I, Gomez H, et al. A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord.* 2009 Jan;19(1):21-5.

Passos-Bueno MR, Moreira ES, Marie SK, Bashir R, Vasquez L, Love DR, Vainzof M, Iughetti P, Oliveira JR, Bakker E, Strachan T, Bushby K, Zatz M. Main clinical features of the three mapped autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families. *J Med Genet.* 1996; 33: 97-102.

Passos-Bueno MR, Vainzof M, Moreira ES, Zatz M. Seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Brazilian population: from LGMD2A to LGMD2G. *Am J Med Genet.* 1999; 82: 392-8.

Pathak P, Sharma MC, Sarkar C, Jha P, Suri V, Mohd H, Singh S, Bhatia R, Gulati S. Limb girdle muscular dystrophy type 2A in India: a study based on semi-quantitative protein analysis, with clinical and histopathological correlation. *Neurol India.* 2010; 58(4): 549-54.

Penttilä S, Palmio J, Suominen T, Raheem O, Evilä A, Gomez NM, Tasca G, Waddell LB, Clarke NF, Barboi A, Hackman P, Udd B. Eight new mutations and the expanding phenotype variability in muscular dystrophy caused by ANO5. *Neurology*. 2012; 78: 897-903.

Piccolo F, Roberds SL, Jeanpierre M, Leturcq F, Azibi K, Beldjord C, Carrie A, Recan D, Chaouch M, Reghis A, et al. Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nat. Genet*. 1995; 10: 243–245.

Piluso G, Politano L, Aurino S, Fanin M, Ricci E, Ventriglia VM, et al. Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes. *J Med Genet*. 2005; 42(9): 686-93.

Pogoda TV, Krakhmaleva IN, Lipatova NA, Shakhovskaya NI, Shishkin SS, Limborska SA. High incidence of 550delA mutation of CAPN3 in LGMD2 patients from Russia. *Hum Mutat*. 2000; 15(3): 295.

Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, Davison K, Pylea A, Bushby KMD. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. *Neuromuscular Disorders*. 2001; 11: 287-296.

Poppe M, Cree L, Bourke J, Eagle M, Anderson LV, Birchall D, Brockington M, Buddles M, Busby M, Muntoni F, Wills A, Bushby K. The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Neurology*. 2003; 60(8): 1246-51.

Richard I, Beckmann JS. How neutral are synonymous codon mutations? *Nat Genet*. 1995; 10(3): 259.

Richard I, Brenguier L, Dincer P, Roudaut C, Bady B, Burgunder JM, et al. Multiple independent molecular etiology for limb-girdle muscular dystrophy type

2A patients from various geographical origins. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(5):1128-38.

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannilkulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell.* 1995; 81: 27–40.

Richard I, Roudaut C, Marchand S, Baghdiguian S, Herasse M, Stockholm D, Ono Y, Suel L, Bourg N, Sorimachi H, Lefranc G, Fardeau M, Sébille A, Beckmann JS. Loss of Calpain 3 Proteolytic Activity Leads to Muscular Dystrophy and to Apoptosis-associated I κ B α /Nuclear Factor- κ B Pathway Perturbation in Mice. *The Journal of Cell Biology.* 2000; 151(7): 1583–1590

Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JE, Anderson LV, Beley C, Cobo AM, de Diego C, Eymard B, et al. Calpainopathy—a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1999; 64 1524–1540.

Saenz A, Leturcq F, Cobo AM et al. LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain.* 2005; 128: 732–742.

Saenz ME, Ramirez-Lorca R, Moron FJ, Ruiz A. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. *Drug Discovery Today.* 2006; 11(19/20):917-923.

Schwartz M, Hertz JM, Sveen M-L, Vissing J. LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker dystrophy phenotype. *Neurology* 2005; 64: 1635–1637.

Sorimachi H, Imajoh OS, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, Suzuki K. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct

from both m- and mu types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1989; 264: 20106–20111.

Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido TC, Kawasaki H, Sugita H, Miyasaka M, Arahata K, Ishiura S, Suzuki K. Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem*. 1993; 268: 10593–10605.

Speer M C, Yamaoka LH, Gilchrist JH, Gaskell CP, Stajich JM, Vance J M, Pericak-Vance MA. Confirmation of genetic heterogeneity in limb-girdle muscular dystrophy: Linkage of an autosomal dominant form to chromosome 5q. *American Journal of Human Genetics*. 1992; 50(6), 1211-1217.

Spencer MJ, Tidball JG, Anderson LV, Bushby KM, Harris JB, Passos-Bueno MR, Somer H, Vainzof M, Zatz M. Absence of calpain 3 in a form of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2A). *J Neurol Sci*. 1997; 146(2): 173-8.

Stensland E, Lindal S, Jonsrud C, Torbergesen T, Bindoff LA, Rasmussen M, Dahl A, Thyssen F, Nilssen. Prevalence, mutation spectrum and phenotypic variability in Norwegian patients with Limb Girdle Muscular Dystrophy 2I. *Neuromuscul Disord*. 2011; 21(1): 41-6.

Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Thomas NST, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med*. 2009; 1:13

Sveen ML, Schwartz M, Vissing J. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol*. 2006; 59(5): 808-15.

Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M, Richard I. Calpain 3 Is Activated through Autolysis within the Active Site and Lyse Sarcomeric and Sarcolemmal Components. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 9127–9135.

Toniolo D & Minetti C. Muscular dystrophies: alterations in a limited number of cellular pathways? *Current Opinion in Genetics & Development*. 1999; 9:275-282.

Urtasun M, Sáenz A, Roudaut C, Poza JJ, Urtizberea JA, Cobo AM, Richard I, García Bragado F, Leturcq F, Kaplan JC, Martí Massó JF, Beckmann JS, López de Munain A. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipúzcoa (Basque Country, Spain). *Brain*. 1998;121: 1735-47.

Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanello RCM, Marie SK, Anderson LVB, Bonnemann CG, McNally EM, Nigro V, Kunkel LM, Zatz M. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5:1963–1969.

Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Marie SK, Oliveira AS, Zatz M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci*. 1999; 15;164(1):44-9.

Vainzof M & Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003; 36: 543-555.

van der Kooi AJ, Frankhuizen WS, Barth PG, Howeler CJ, Padberg GW, Spaans F, Wintzen AR, Wokke JH, van Ommen GJ, de Visser M, Bakker E, Ginjaar HB. Limb-girdle muscular dystrophy in the Netherlands: gene defect identified in half the families. *Neurology*. 2007; 68: 2125-28.

van der Kooi AJ, van Meegen M, Ledderhof TM, McNally EM, de Visser M, Bolhuis PA. Genetic Localization of a Newly Recognized Autosomal Dominant Limb-Girdle Muscular Dystrophy with Cardiac Involvement (LGMD1 B) to Chromosome 1 q1 1-21. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60:891-895.

Walter MC, Petersen JA, Stucka R, Fischer D, Schröder R, Vorgerd M, Schroers A, Schreiber H, Hanemann CO, Knirsch U, Rosenbohm A, Huebner A, Barisic N, Horvath R, Komoly S, Reilich P, Müller-Felber W, Pongratz D, Müller JS, Auerswald EA, Lochmüller H. FKRP (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet.* 2004; 41(4): e50.

Worman HJ & Bonne G. "Laminopathies": A wide spectrum of human diseases. *Experimental Cell Research.* 2007; 313(10): 2121–2133.

Zatz M, de Paula F, Starling A, Vainzof M. The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 2003; 13(7-8): 532-44.

Zatz M, Starling A. Calpains and Disease. *The New England Journal of Medicine.* 2005; 352: 2413-23.

Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR. Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. *Curr Opin Neurol.* 2000; 13: 511-7.